

10/089982

Attorney Docket No.: 15675P398  
Express Mail No.: EL651 65US

3013 RECEIVED TO U.S. APR 2002

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the Application of:

EVELYNE LOPEZ, ET AL.

For: **METHOD FOR PREPARING A COMPOSITION BY  
MOTHER-OF-PEARL EXTRACTION, COMPRISING  
INTEGRALLY MOTHER-OF-PEARL COMPONENTS,  
COMPOSITION OBTAINED BY SAID METHOD AND USE  
THEREOF IN COSMETICS AND DERMATOLOGY**

Honorable Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

**Request for Priority**

Sir:

Applicant respectfully requests a convention priority for the above-captioned application, namely  
France application number 99/12409 filed October 5, 1999.

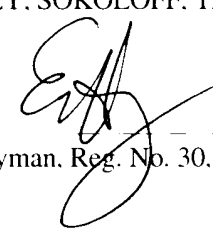
☐ A certified copy of the document is being submitted herewith.

Respectfully submitted,

BLAKELY, SOKOLOFF, TAYLOR & ZAFMAN

Dated: \_\_\_\_\_

4/3/02

  
Eric S. Hyman, Reg. No. 30,139

12400 Wilshire Blvd., 7th Floor  
Los Angeles, California 90025  
Telephone: (310) 207-3800





PCT/FR

00/02766  
10/089982

0012255

4

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

REC'D 27 NOV 2000

WIPO PCT

**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 10 NOV. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

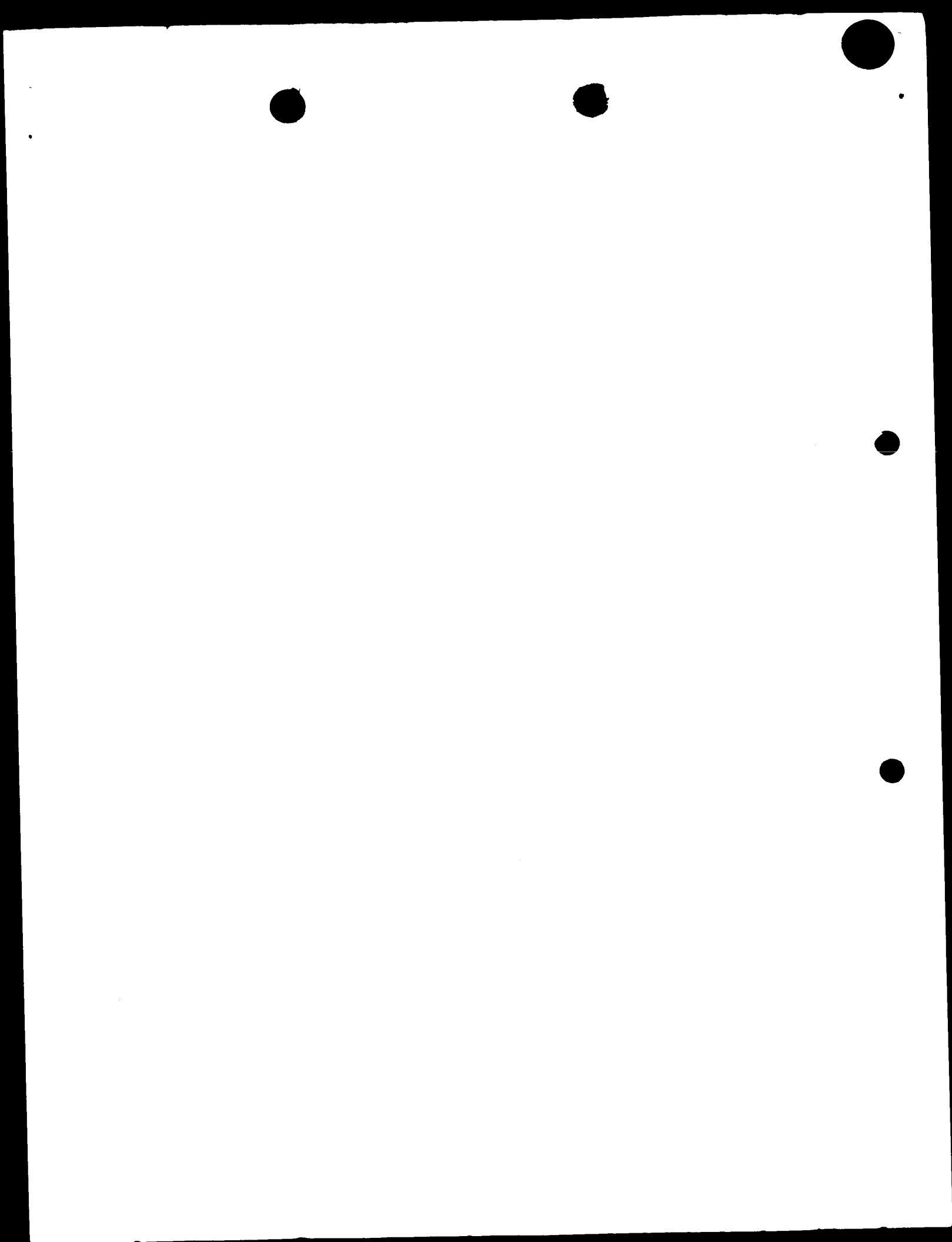
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 06  
Telephone 01 53 04 53 04  
Telecopie 01 42 93 59 30  
http www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Reservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **5 OCT 1999**  
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9912408**  
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**  
DATE DE DÉPÔT **0 5 OCT. 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET REGIMBEAU**  
**26, Avenue Kléber**  
**75116 PARIS**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande  
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

telephone

**237840 D18208 JW**

**01 45 00 92 02**

date

Établissement du rapport de recherche

☐ diffère

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**Procédé de préparation d'une composition comprenant l'intégralité des composants de la nacre,  
au moins un collagène et/ou un protéoglycane, composition obtenue par ce procédé et son  
utilisation en pharmacie et cosmétique.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)**

Forme juridique

**ETABLISSEMENT PUBLIC A CARACTERE  
SCIENTIFIQUE ET TECHNO...**

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**3, rue Michel Ange, 75016 PARIS**

Pays

**FR**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

*[Signature]*  
**92-1001**

*[Signature]*

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

08 113 W / 260899

**Vos références pour ce dossier**

(facultatif) 237840 D18208 MW

**N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL**

99 12409

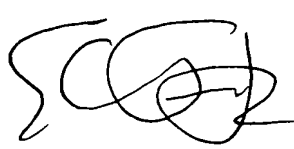
**TITRE DE L'INVENTION** (200 caractères ou espaces maximum)

Procédé de préparation d'une composition comprenant l'intégralité des composants de la nacre, au moins un collagène et/ou un protéoglycane, composition obtenue par ce procédé et son utilisation en pharmacie et cosmétique.

**LE(S) DEMANDEUR(S) :**

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) : 3, rue Michel Ange, 75016 PARIS - FRANCE

**DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :** (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		CHEMOUNI Alfred, Edouard	
Prénoms			
Adresse	Rue	27 rue de la Villette	75019 PARIS FRANCE
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LOPEZ Evelyne	
Prénoms			
Adresse	Rue	23, avenue de la Bourdonnais	75007 PARIS FR
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		le 05/10/00  92-1142	

La présente invention se rapporte à un procédé de préparation d'une composition comprenant l'intégralité des composants de la nacre, au moins un collagène et au moins un protéoglycane, à la composition susceptible d'être obtenue par ce procédé et à l'utilisation de cette dernière tant dans les domaines pharmaceutique que cosmétique, en particulier pour lutter contre les effets du vieillissement cutané et/ou des phanères.

Les mammifères se protègent du milieu extérieur par une barrière constituée par la peau, tissu très structuré, composé de plusieurs couches, mais sensible aux agressions dues aux variations du milieu extracorporel. Cette situation est unique dans le règne animal puisque les poissons et les grenouilles sécrètent du mucus, les oiseaux sont couverts de plumes et les vertébrés submammaliens et mammaliens, sauf les hominidés actuels, sont couverts de poils.

L'être humain a perdu ces attributs protecteurs : il a une peau qu'il faut protéger et qu'il est possible de stimuler afin de l'aider à lutter contre les agressions et le vieillissement.

En particulier, on sait que le vieillissement est un phénomène physiologique qui se traduit notamment par un amincissement de la peau et une perte de l'élasticité, conduisant notamment à l'apparition de rides plus ou moins profonde. On peut également constater un relâchement ou dessèchement superficiel et une pigmentation anarchique.

La peau comprend trois couches : l'épiderme, le derme et, en profondeur, l'hypoderme.

L'enveloppe protectrice la plus externe de la peau, l'épiderme, qui recouvre étroitement le derme, est constituée en surface du stratum corneum. Le stratum corneum est fait de deux couches : le stratum disjunctum en surface dont la particularité est la desquamation et le stratum compactum, le plus profond, qui joue un rôle de barrière. L'épiderme, facile à observer macroscopiquement puisque superficiel, a fait l'objet de nombreuses études. Les réponses connues sont celles entraînées par certains agents du milieu extracorporel ou bien celles résultant d'applications de substances actives d'origines diverses. Les cellules de l'épiderme résultent de l'activité des cellules de la couche basale qui reposent sur une membrane basale séparant l'épiderme du derme.

Le derme résulte de l'activité biosynthétique des fibroblastes, qui élaborent les constituants de la matrice extracellulaire. Celle-ci est formée de quatre grandes familles de macromolécules : les collagènes, l'élastine, les glycoprotéines de structure et les protéoglycannes. Le derme a la faculté de répondre aux signaux donnés par l'épiderme  
 5 qui en réponse envoie également des signaux à l'épiderme. D'une manière générale, il existe des échanges entre ces différentes couches dermiques et épidermiques de la peau, qui sont destinés à assurer le renouvellement cellulaire, la cohésion et l'hydratation des couches externes.

De nombreux actifs ont été proposés pour prévenir ou retarder les effets du  
 10 vieillissement.

Parmi ceux-ci, la nacre a été utilisée depuis l'Antiquité en esthétique et dans les pharmacopées traditionnelles. Par ailleurs, la nacre est connue pour ses propriétés régénératrices des os.

On sait en particulier que la nacre, ou aragonite chonchylifère, est une formation  
 15 minéralisée biogène; elle est constituée d'une matrice organique de substances fibreuses et non fibreuses représentant environ 1,7 à 2 % de la masse totale (Taylor et al, Bulletin of the British Museum (Natural history) Zoology.Suppl.3125pp. + 29 Planches, 1969) et de carbonate de calcium cristallisé sous forme orthorhombique, appelé aragonite, associé à des oligo-éléments (sodium, magnésium, lanthane, zinc, brome, césium, fer,  
 20 manganèse, chlore, cuivre, potassium, calcium, strontium et soufre). Plus particulièrement, la phase organique totale de la nacre se présente sous la forme d'une matrice organique composée de protéines fibreuses, constituées notamment de collagènes ancestraux dépourvus d'hydroxyproline et d'hydroxylysine, et de protéines non fibreuses. Environ 50% de la matrice organique de la nacre est hydrosoluble (ou  
 25 "water soluble"). Les 50 % restants ne peuvent être obtenus qu'après décalcification.

Toutefois, les produits de l'art antérieur, obtenus par mélange d'une poudre de nacre avec un excipient ou un diluant inerte, pulvérulent, comme décrit par exemple dans la demande W0 97/23231, provoquent des phénomènes indésirables d'irritation de la peau, dus la présence de la nacre sous forme de poudre (en particulier de son  
 30 composant majoritaire, l'aragonite ou  $\text{CaCO}_3$ ). La teneur en poudre de nacre dans ces produits doit donc impérativement être très limitée pour éviter ces phénomènes d'irritation. Ces phénomènes indésirables d'irritation ont notamment pour origine le pH



trop basique de ces produits connus, au contact de la peau. En outre, les produits connus à base de poudre de nacre présentent des problèmes spécifiques de formulations, notamment de stabilité (ruptures d'émulsions) et d'ajustement du pH à une valeur moins basique.

5 Par ailleurs, la demande WO 97/24133 décrit un procédé de préparation de substances biologiquement actives à partir de la nacre, par mise en contact d'une poudre de nacre avec un solvant aqueux choisi parmi l'eau pure, bidistillée ou apyrogène, éventuellement additionné de sels, dans lequel on sépare ensuite la fraction hydrosoluble de façon à ne récupérer que la fraction aqueuse, essentiellement donc  
10 dépourvue des constituants minéraux et de la phase organique non hydrosoluble de la nacre. Ce procédé ne peut donc permettre en particulier la préparation d'une composition comprenant notamment l'intégralité des composants de la nacre, en particulier la phase organique totale de la nacre.

On a maintenant constaté de manière tout à fait surprenante et inattendue que la  
15 mise en oeuvre d'un procédé spécifique permet d'obtenir une composition nouvelle, comprenant non seulement l'intégralité des composants de la nacre mais aussi une association avantageuse de ces derniers avec certains composés qui permettent au moins de potentialiser l'activité des composants de la nacre, sinon de fournir un effet de synergie, en vue notamment prévenir et / ou de réduire de manière visible les effets liés  
20 au vieillissement de la peau et/ou des phanères.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de préparation d'une composition, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

a) à réduire de la nacre en une poudre de granulométrie comprise entre environ 1 et environ 300  $\mu\text{m}$ ;

25 b) à mettre la poudre de nacre ainsi obtenue en contact intime avec un agent d'extraction sous la forme d'une solution hydroglycolique d'au moins un collagène, d'au moins un protéoglycane ou d'un mélange de ces derniers; puis

c) à récupérer le mélange d'extraction, formé par la mise en contact intime, constituant la composition désirée.

30 Le présent procédé permet d'obtenir une composition sous la forme du mélange d'extraction obtenu à l'étape b).

La nacre utilisée pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention peut être obtenue à partir de coquilles de mollusques nacriers et de certains céphalopodes (par exemple le nautilus). En particulier, on l'obtient à partir d'huîtres telles que *Pinctada maxima*.

5 On utilise la nacre brute, débarrassée des autres éléments de coquille riches en polysaccharides et calcite. De préférence, on part de nacre blanche, sinon il faut prévoir une étape d'élimination des pigments qui peuvent provoquer des intolérances.

Il s'agit d'une matière première aisément disponible, dont l'utilisation n'a pas d'impact écologique négatif sur les populations naturelles. En effet, la plupart de ces  
10 huîtres ou autres mollusques nacriers font l'objet d'une aquaculture.

De plus, un avantage supplémentaire est donné par le fait que la matière première peut être obtenue à partir de coquilles d'huîtres ayant produit des perles ; en effet, une huître perlière est éliminée du pool productif après avoir produit successivement au maximum 3 perles, alors qu'elle possède une épaisse couche de  
15 nacre de qualité excellente (grade A). La présente invention propose donc un débouché supplémentaire pour une utilisation de la nacre en aval de la perliculture.

La granulométrie de la poudre de nacre utilisée pour la mise en oeuvre du présent procédé est comprise entre environ 1 et environ 300  $\mu\text{m}$ , telle que mesurée avec des moyens classiques à la portée de l'homme du métier, comme la technique de  
20 tamisage et/ou la technique à lecture LASER.

Selon un mode de mise en oeuvre particulier du procédé selon l'invention, la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise entre environ 50 et environ 100  $\mu\text{m}$ .

Selon un autre mode de mise en oeuvre particulier, la nacre est réduite en une  
25 poudre de granulométrie comprise entre environ 15 et environ 50  $\mu\text{m}$ , ce qui permet d'améliorer le rendement, en approchant de la taille de l'unité cristalline (par exemple, l'unité élémentaire de la nacre de *Pinctada maxima* est le biocristal, un cristal hexagonal d'aragonite très volumineux de 9 à 12  $\mu\text{m}$ ).

On procède en particulier de la manière suivante pour réduire la nacre en poudre  
30 selon l'étape a) du présent procédé.

Dans une première phase, la nacre brute est débarrassée de la partie externe de la coquille (péριοstracum) par meulage ou tout autre procédé non dénaturant.

Les plaques de nacre sont ensuite réduites en fragments par concassage afin de pouvoir ensuite procéder à une micronisation. Les fragments destinés à être micronisés  
5 ont de préférence une longueur comprise entre environ 2 à environ 5 centimètres et une épaisseur d'environ 0,3 centimètres.

Dans une seconde phase, ces fragments sont micronisés.

La nacre peut être utilisée sans décontamination préalable. Dans le cas d'une décontamination préalable, on réalise un lavage décontaminant très rapide, sans  
10 trempage des fragments, dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6,6% de chlore actif (12°). Le séchage doit être fait extemporanément de façon à retirer toute trace d'eau.

Le meulage doit être réalisé à sec dans des jarres en zirconium réservées exclusivement à cet effet, précédemment lavées (eau javellisée, rinçage, puis lavage à  
15 l'eau distillée) et stérilisées à chaud. Le concassage se fait au moyen de billes en zirconium, elles-mêmes stérilisées.

La stérilisation de la nacre brute réduite en poudre peut être réalisée de deux façons différentes :

- stérilisation par irradiation aux rayons  $\gamma$  2,5 Mrad;
- 20 - stérilisation à chaud pendant 1 à 2 heures dans un autoclave à 100 °C. La nacre n'est dégradée (matrice minérale et matrice organique) qu'à partir d'environ 250 °C ( Balmain, Hannoyer and Lopez, "Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of Mother of Pearl (nacre) from the shell of the mollusc Pinctada Maxima", J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.), vol.48(5):749-754, 1999). Cette stérilisation ne détruit donc pas ses  
25 différents composants.

L'étape b) du procédé selon l'invention consiste à mettre la poudre de nacre décrite ci-dessus en contact intime avec un agent d'extraction sous la forme d'une solution hydroglycolique d'au moins un collagène, d'au moins un protéoglycane ou  
30 d'un mélange de ces derniers.

Par "solution hydroglycolique", on entend selon l'invention une solution du collagène et du protéoglycane obtenue en utilisant un solvant hydroglycolique c'est à

dire, d'une manière générale, un solvant sous forme d'un mélange d'eau et d'au moins un glycol.

Par "glycol", on entend de manière connue tout composé possédant deux fois la fonction alcool. En particulier, le glycol pouvant être utilisé est choisi dans le groupe  
5 constitué par l'éthylène glycol, le propylène glycol, le butylène glycol et les mélanges de ces derniers.

L'eau pouvant être utilisée pour former le solvant hydroglycolique peut être de l'eau pure, bidistillée, apyrogène, déminéralisée ou encore de l'eau déionisée.

Le rapport pondéral eau:glycol dans le solvant hydroglycolique est de préférence  
10 compris entre environ 1 : 100 et environ 100 : 1 , et plus particulièrement entre environ 1 : 1 et environ 20 : 1 .

De préférence, l'agent d'extraction est une solution hydroglycolique d'au moins un collagène.

Le collagène pouvant être utilisé en solution hydroglycolique dans l'agent  
15 d'extraction selon l'invention peut être tout collagène constituant la substance intercellulaire du tissu conjonctif, disponible dans le règne animal, connu de l'homme du métier.

On utilise tout particulièrement de préférence un collagène marin, c'est à dire un collagène issu d'un organisme d'origine marine tels que les vertébrés marins. En  
20 particulier, le collagène marin est le principal constituant des tissus conjonctifs du poisson, où il tient un rôle essentiel dans la structure de la peau, des muscles, des tendons et des ligaments.

On peut citer tout particulièrement le collagène marin "PANCOGENE<sup>R</sup> MARIN", tel que commercialisé par la société Gattefossé (Saint Priest, France), dont la  
25 dénomination INCI est "Soluble Collagen" (référencement au Japon : "water soluble collagen"; MHV : 20800CZY0010000). Il s'agit d'un collagène extrait de peaux de poissons d'espèces non protégées des mers chaudes appartenant à la classe des Téléostéens.

On peut également citer le collagène marin "COLLAGENE NATIF MARIN -  
30 Code 690", tel que commercialisé par la société Laboratoire Industriel de Biologie (Soisy Sous Montmorency, France) dont la dénomination CTFA est "Amino Collagen

Amino Acid". Il s'agit d'un collagène acide soluble dans l'eau, extrait des peaux de poissons.

De préférence, on utilise une concentration en collagène comprise entre environ 0,0001 et environ 50 % en poids, et plus particulièrement entre environ 0,01 et environ 15 % en poids, par rapport au poids total de l'agent d'extraction.

L'agent d'extraction est également de préférence une solution hydroglycolique d'au moins un protéoglycane.

Le protéoglycane pouvant être utilisé en solution hydroglycolique dans l'agent d'extraction selon l'invention peut être tout protéoglycane connu de l'homme du métier, notamment tout protéoglycane non soufré.

En particulier, le protéoglycane est choisi dans le groupe constitué par l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'éparane sulfate, le kératane sulfate et les mélanges de ces derniers.

L'acide hyaluronique est tout particulièrement préféré, tel que celui commercialisé par la société Laboratoire Industriel de Biologie (Soisy Sous Montmorency, France).

La concentration en protéoglycane utilisé est de préférence comprise entre environ 0,0001 et environ 40 % en poids, et plus particulièrement entre environ 0,01 et environ 10 % en poids, par rapport au poids total de l'agent d'extraction.

Bien entendu, l'agent d'extraction peut comprendre en outre tout composé additionnel connu de l'homme du métier, approprié pour l'étape d'extraction elle-même ou en vue des utilisations possibles de la composition préparée par le présent procédé, comme celles décrites ci-après. L'agent d'extraction peut ainsi par exemple comprendre en outre des agents complexants tels que l'EDTA (acide (éthylène-diamine)tétraacétique).

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré de la présente invention, on met la poudre de nacre en contact intime avec l'agent d'extraction selon l'étape b) en réalisant un mélange, constitué par la poudre de nacre et l'agent d'extraction, tel qu'il comprend, par rapport à son poids total, environ 20 à environ 60 % en poids de poudre de nacre obtenue à l'étape a), telle que décrite ci-dessus, et le reste en agent d'extraction tel que décrit ci-dessus.

La mise en contact intime de la poudre de nacre avec l'agent d'extraction, selon l'étape b) du présent procédé, peut notamment être effectuée par mise en suspension de la poudre de nacre dans l'agent d'extraction, sous agitation mécanique forte et homogène, pour permettre un enrobage d'extraction des particules de nacre.

5        On peut par exemple procéder à température ambiante c'est à dire à une température de l'ordre de 20 °C pendant environ 1 heure, mais les durées et les températures peuvent être adaptées, par l'homme du métier, notamment en fonction de la granulométrie de départ de la poudre de nacre.

10        Selon un autre mode de réalisation, l'étape b) de mise en contact peut être effectuée par passage sous pression de l'agent d'extraction à travers la poudre de nacre immobilisée. Cette immobilisation peut par exemple être effectuée par une colonne, de type CLHP, éventuellement en mélange avec des substances de charge permettant une meilleure diffusion de l'agent d'extraction et évitant le compactage de la poudre de nacre.

15        Sans vouloir toutefois être lié à une quelconque théorie, on pense que la présence du collagène et du protéoglycane dans l'agent d'extraction, en particulier du collagène marin et de l'acide hyaluronique, favoriserait l'extraction de composés apparentés présents dans la nacre, par un phénomène physico-chimique d'affinité, avec en outre une potentialisation des effets des composants ainsi extraits de la nacre. En  
20        particulier, on pense que l'extraction des collagènes ancestraux de la nacre serait favorisée par la présence des collagènes marins et l'extraction tant des protéines d'adhésion (décorine et cytokines) que des protéoglycannes de la nacre serait favorisée par la présence du protéoglycane choisi.

25        Quoi qu'il en soit, de préférence, on réalise la mise en contact intime, pour une température donnée, pendant un temps suffisant pour réaliser une extraction pratiquement complète. Par "extraction pratiquement complète", on entend selon l'invention l'extraction de tous les composants extractibles de la nacre lors de sa mise en contact avec l'agent d'extraction.

30        En d'autres termes, l'obtention d'un équilibre des concentrations totales notamment en collagènes ou en protéoglycannes dans la phase liquide hydroglycolique correspond à l'obtention de ladite "extraction pratiquement complète".

Il est donc à la portée de l'homme du métier de déterminer le caractère "pratiquement complet" d'une telle extraction, par exemple par des mesures régulières de ces concentrations totales en collagènes ou en protéoglycannes dans la phase liquide hydroglycolique.

5       Quoi qu'il en soit, l'étape de mise en contact peut comprendre avant sa fin une période de repos (arrêt de l'agitation) de la suspension de la poudre de nacre dans l'agent d'extraction.

A la fin de l'étape b) de mise en contact, on récupère le mélange d'extraction, formé par la mise en contact intime, constituant la composition désirée.

10       Cette composition, sous forme d'une suspension hydroglycolique, peut être conservée telle qu'elle avant utilisation. Pour des raisons pratiques de mise en oeuvre ultérieure (stockage, transport, formulation etc.) on peut également séparer la phase liquide de la phase solide de cette composition.

15       Ainsi, selon une variante, le procédé selon l'invention est caractérisé en ce que, à la fin de l'étape b), on récupère le mélange d'extraction, formé par la mise en contact intime, constituant la composition désirée, et l'on sépare la phase liquide de la phase solide de la composition par des moyens connus de l'homme du métier, tels que des moyens d'ultra-filtration, de filtration tangentielle etc.

20       On comprend que les phases solide et liquide ainsi séparées constituent ensemble la composition préparée comme décrit ci-dessus. On peut ainsi prévoir que, lors d'une formulation ultérieure utilisant cette composition, avec des excipients pharmaceutiquement ou cosmétiquement appropriés, la composition peut être reconstituée à toute étape de la formulation, par adjonction simultanée ou séparée dans le temps des phases solide et liquide respectives, pour des raisons de commodités de  
25       mise en formulation. Compte tenu de ce qui précède, on comprend que la présente invention a également pour objet la phase liquide telle qu'obtenue à l'issue de l'étape de séparation décrite ci-dessus. De même, la présente invention a aussi pour objet la phase solide telle qu'obtenue à l'issue de l'étape de séparation décrite ci-dessus.

30       La présente invention a également pour objet une composition nouvelle, susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit ci-dessus (comprenant les phases solides et liquides, avec ou sans étape de séparation comme décrit ci-dessus).

En particulier, cette composition est caractérisée par le fait qu'elle comprend au moins, sous forme d'une suspension hydroglycolique d'une phase liquide et d'une phase solide :

- de l'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) ;
- 5        - des oligo-éléments choisis dans le groupe constitué par le sodium, le magnésium, le lanthane, le zinc, le brome, le césium, le fer, le manganèse, le chlore, le cuivre, le potassium, le calcium, le strontium, le soufre et les mélanges de ces derniers;
- des protéines fibreuses de la nacre, notamment des collagènes ancestraux de la nacre apparentés aux collagènes marins de l'agent d'extraction (voir Figure 1 décrite ci-
- 10    après);
- des protéines non fibreuses de la nacre, notamment des protéines apparentées aux protéines d'adhésion telles que la Décorine (voir Figure 2 décrite ci-après);
- au moins un collagène non issu de la nacre et/ou au moins un protéoglycane non issu de la nacre.

15        On comprend bien entendu que par "collagène non issu de la nacre" et par "protéoglycane non issu de la nacre" on entend respectivement selon l'invention le collagène et le protéoglycane utilisés pour l'agent d'extraction de l'étape b) du présent procédé. De même, l'expression "suspension hydroglycolique" s'explique par le fait que la composition selon l'invention comprend non seulement des composants solubles (en

20    solution hydroglycolique) mais aussi des composants non solubles (notamment l'aragonite).

Par ailleurs, les préférences énoncées ci-dessus pour le procédé selon l'invention s'appliquent bien entendu à cette composition.

Ainsi, en particulier, le collagène non issu de la nacre dans la composition selon

25    l'invention est de préférence un collagène marin et plus particulièrement un collagène marin choisi dans le groupe constitué par le "PANCOGENE<sup>R</sup> MARIN", le "COLLAGENE NATIF MARIN - Code 690" et les mélanges de ces derniers. De même, le protéoglycane non issu de la nacre peut être tout protéoglycane connu de l'homme du métier, notamment tout protéoglycane non soufré, et est en particulier

30    choisi dans le groupe constitué par l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'éparane sulfate, le kératane sulfate et les mélanges de ces derniers, et est plus particulièrement l'acide hyaluronique.



Comme le montrent plus en détail les exemples ci-après, cette composition présente des propriétés très intéressantes vis à vis de la peau et/ou des phanères, notamment des propriétés de régénération tissulaire, permettant par exemple une cicatrisation améliorée, ainsi que des propriétés anti-âge permettant de prévenir et / ou de réduire de manière visible les effets liés au vieillissement de la peau et/ou des phanères. Au niveau des différents types cellulaires de la peau, elle présente une action réparatrice et régulatrice de l'équilibre physiologique entre ses différents constituants. Plus particulièrement, ses composantes organiques et minérales agissant en particulier à plusieurs niveaux sur le métabolisme des kératinocytes. Cette composition permet une restructuration de l'épiderme, contribuant à une meilleure protection des couches les plus profondes. L'épiderme devient plus résistant, plus profond et en continuelle interaction avec le derme. De plus, cette composition permet un enrichissement en élastine et en collagènes. La peau est plus élastique et plus ferme. Elle est résistante et ses composantes se renouvellent à un rythme soutenu. En outre, cette composition stabilise les synthèses pigmentaires et favorise la microcirculation. Enfin, cette composition présente l'avantage d'une innocuité totale et celui d'avoir un effet anti-inflammatoire, donc apaisant.

Ainsi, la présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend, en tant que principe actif, la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, et un excipient pharmaceutiquement acceptable.

De préférence, l'excipient pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié pour une application dermatologique.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cette composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des troubles de la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères.

Par ailleurs, la présente invention a pour objet l'utilisation de la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des troubles de la peau et/ou des phanères liés au vieillissement.

Enfin, la présente invention a pour objet l'utilisation de la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé tel que décrit ci-dessus, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des manifestations cutanées inflammatoires.

5 La présente invention a encore pour objet une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, en tant que principe cosmétiquement actif, la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention, et un excipient cosmétiquement acceptable.

On peut utiliser tout excipient cosmétique connu de l'homme du métier.

10 Bien entendu, la composition cosmétique selon l'invention peut contenir en outre des ingrédients de type cosmétique connus de l'homme du métier, tels que des agents hydratants, des agents adoucissants, ou encore des filtres chimiques ou organiques.

Les compositions pharmaceutiques et cosmétiques décrites ci-dessus peuvent en particulier se présenter sous la forme d'une crème, d'une pommade, d'un gel, d'une  
15 lotion, d'une émulsion huile-dans-eau, d'une émulsion eau-dans-huile ou peuvent être associées à tout vecteur pharmaceutiquement ou cosmétiquement acceptable tels que des liposomes.

En outre, la présente invention a pour objet l'utilisation de la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon  
20 l'invention, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée au traitement cosmétique pour la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères.

Par ailleurs, la présente invention a pour objet l'utilisation de la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon  
25 l'invention, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée au traitement cosmétique des modifications liées au vieillissement de la peau et/ou des phanères.

La présente invention a enfin pour objet une méthode de traitement cosmétique pour la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau et/ou les phanères la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

30 La présente invention a par ailleurs pour objet une méthode de traitement cosmétique des modifications liées au vieillissement de la peau et/ou des phanères,

caractérisée en ce qu'on applique sur la peau et/ou les phanères la composition nouvelle telle que décrite ci-dessus, susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'invention.

Les Figures 1 et 2 représentent un Western blot d'une composition préparée par le procédé selon l'invention.

5 La Figure 3 représente un histogramme de la composition globale en acides aminés de la phase protéique d'une composition préparée par le procédé selon l'invention.

Les Figures 4 et 5 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur la synthèse de cytokératines par des kératinocytes  
10 humains.

Les Figures 6 et 7 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur des kératinocytes humains en culture sevrés en oestradiol.

Les Figures 8 et 9 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur la synthèse de cytokératines par des kératinocytes  
15 humains en culture sevrés en oestradiol.

Les Figures 10 et 11 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur la synthèse d'élastine par les fibroblastes humains.

Les Figures 12 et 13 sont des photographies illustrant l'effet des oestrogènes sur des fibroblastes humains.

20 Les Figures 14 et 15 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur des fibroblastes humains sevrés en oestradiol.

La figure 16 est un histogramme illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur les mélanocytes par la modification de la quantité de mélanine captée par des kératinocytes mis en culture en présence de la composition.

25 Les Figures 17 et 18 sont des photographies illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur la quantité de mélanine captée par des kératinocytes humains cultivés.

La Figure 19 est un histogramme illustrant l'effet de la composition préparée selon l'invention sur la sécrétion de l'interleukine 1 (IL-1) par les cellules  
30 promyélocytiques HL 60.

Enfin, la Figure 20 est un histogramme illustrant l'étude de la non cytotoxicité de la composition préparée selon l'invention.

Les exemples suivants sont destinés à illustrer la présente invention mais ne doivent en aucun cas être interprétés comme pouvant en restreindre la portée.

### Exemple 1 : procédé de préparation d'une composition selon l'invention

5 Le matériel utilisé doit être un matériel type sous vide, bien étanche, de préférence en Inox. Il doit être précédemment lavé et rincé proprement de façon à éviter tout risque de contaminations bactériennes.

1.1) On utilise de la nacre de *Pinctada maxima* déjà débarrassée de la partie  
10 externe de la coquille (périostracum) et mise sous forme de fragments irréguliers (fournie par la société Pharma Futura 10, rue de Charonne, 75012 PARIS). Les fragments sont de taille comprise entre 2 à 5 centimètres de longueur et 0,3 centimètres d'épaisseur.

On effectue un lavage décontaminant très rapide sans trempage des fragments  
15 dans une solution d'hypochlorite de sodium à 6,6% de chlore actif (12°) puis un séchage extemporané de façon à retirer toute trace d'eau.

Le meulage pour la micronisation doit être réalisé à sec dans des jarres en zirconium réservées exclusivement à cet effet, précédemment lavées (eau javellisée + rinçage + lavage eau distillée) et stérilisées à chaud. Le broyage se fait au moyen de  
20 billes en zirconium, elles-mêmes stérilisées.

La poudre de nacre micronisée ainsi obtenue présente une granulométrie comprise entre 50 et 150  $\mu\text{m}$ . Elle est ensuite stérilisée par irradiation aux rayons  $\gamma$  2,5 Mrad.

La poudre de nacre micronisée ainsi réalisée présente les caractéristiques  
25 suivantes :

- Aspect	Pulvérulent
- Couleur	Blanche
- Odeur	Caractéristique de la Nacre
- Arsenic	< 1ppm
30 - Métaux lourds	< 10 ppm.

Analyse bactériologique :

- Numéro des germes aérobies	1 550/g
------------------------------	---------

- Degré d'hygrométrie

0,3 %

1.2) On réalise le mélange suivant : 400 grammes de poudre de nacre de Pinctada Maxima micronisée comme décrit ci-dessus (granulométrie comprise entre 50 et 150  $\mu$ m) sont ajoutés progressivement à 600 ml d'un agent d'extraction sous forme d'une solution hydroglycolique (eau et éthylèneglycol respectivement selon un rapport pondéral 10 : 1) comprenant 0,18 % en poids du collagène marin "PANCOGENE<sup>R</sup> MARIN" (commercialisé par la société Gattefossé; Saint Priest, France; dénomination INCI : "Soluble Collagen"; référencement au Japon : "water soluble collagen"; MHV : 20800CZY0010000), et 0,2 % en poids d'acide hyaluronique (commercialisé par la société Laboratoire Industriel de Biologie; Soisy Sous Montmorency, France), par rapport au poids total de l'agent d'extraction, sous agitation à environ 4000 tours/minutes et à une température d'environ 20 °C. L'addition étant terminé, on maintient l'agitation et la température pendant 60 minutes. L'agitation doit être forte et homogène de façon à mettre toutes les particules du mélange en contact et permettre un enrobage d'extraction.

Le mélange est ensuite laissé au repos pendant 6 heures.

La composition ainsi obtenue se compose d'une phase solide particulière blanc-cassé, en suspension dans une phase liquide et a un pH d'environ 8.

Cette composition comprend :

- de l' aragonite ( $\text{CaCO}_3$ );
- des oligo-éléments marins : sodium, magnésium, lanthane, zinc, brome, césium, fer, manganèse, chlore, cuivre, potassium, calcium, strontium et soufre (voir Tableau 1 ci-dessous);
- des protéines fibreuses : différents types de protéines apparentées aux collagènes marins, pouvant être considérées comme des collagènes ancestraux de la nacre, et le collagène marin "PANCOGENE<sup>R</sup> MARIN";
- des protéines non fibreuses : protéoglycannes, dont l'acide hyaluronique de la nacre et l'agent d'extraction, ainsi que des protéines d'adhésion de la nacre (décorine rp et cytokines rp; "rp signifiant "related peptides or proteins" ou "peptides ou protéines apparentés", c'est à dire des peptides ou protéines apparentés respectivement à la

décorine et à la cytokine dans la mesures où ils sont reconnus par les anticorps tournés contre ces dernières molécules).

Les techniques utilisées pour l'identification des peptides et protéines dans le cadre de la présente invention sont celles décrites dans les articles suivants :

5           - électrophorèse - Méthode SDS-Page : méthode de Laenli, Nature 1970, 227 680-682;

          - immunotransfert : Western blot selon Towbin H. et al, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(9) : 4350-4354 et Burnette W.N. 1981, Analytical Biochemistry 112 : 195-203.

10           Les Western blot correspondants sont représentés aux Figures 1 et 2.

          L'analyse en acides aminés de la phase protéique indique la présence d'acide aspartique, de thréonine, de serine, d'acide glutamique, de glycine, d'alanine, de proline, de valine, de methionine, d'isoleucine, de leucine, de tyrosine, de phenylalanine, d'histidine, de lysine, et d'arginine. La Figure 3 représente un histogramme de la

15           composition globale en acides aminés.

          La composition obtenue comme décrit ci-dessus sera dénommé dans ce qui suit par "composition A".

20           **Tableau 1 : analyse quantitative des oligo-éléments contenus dans la composition A**

Elément	Concentration moyenne (µg/g)	Elément	Concentration moyenne (g/100g)
Soufre	0,02	Calcium	38,8
Magnésium	2		
Lanthane	0,28		
Zinc	0,4		
Brome	1,78		
Césium	5,5		
Fer	13,6		
Manganèse	50		
Chlore	296		
Cuivre	143		
Potassium	582		
Strontium	1000		
Sodium	5420		

## Exemple 2 : étude de l'activité de la composition A

La recherche scientifique, histologique et cytologique qui utilise soit des modèles *in vivo* animaux, soit des cultures de cellules humaines en faisant appel à la microscopie et aux techniques les plus modernes de détection de substances par immunologie et immunocytochimie permet actuellement une étude à l'échelle cellulaire qui a été mise en pratique pour expérimenter les substances actives de cette composition A .

Cette étude a essentiellement porté sur trois types de cellules dans la mesure où celles-ci jouent de manière connue un rôle majeur dans la structure, le fonctionnement et la pigmentation du tissu cutané : les kératinocytes, les fibroblastes et les mélanocytes. Les deux types cellulaires, kératinocytes et fibroblastes, possèdent les récepteurs spécifiques aux substances actives de la composition A et en particulier de l'ensemble des composants de la nacre qui y sont présents, entraînant une cascade de messages pouvant atteindre le niveau des couches les plus profondes du derme.

L'étude a non seulement porté sur leur aspect morphologique mais aussi le comportement de leurs composants majeurs, noyaux et cytoplasme, témoignant de leur activité de synthèse et de leur capacité de renouvellement. La présence de certaines substances actives ainsi que celle de protéines de structure sécrétées a également été identifiée.

### 1.1) Activité de la composition A sur les kératinocytes : Synthèse de cytokératines par des kératinocytes humains cultivés en présence de la composition A

#### 1.1.1) Méthode

Les kératinocytes sont les cellules les plus externes de notre corps. Ils constituent notre première barrière de protection. Les kératinocytes interviennent en agissant de manière passive et active. C'est en constituant une barrière qui joue le rôle de bouclier que les kératinocytes élaborent la protection passive. Ce bouclier est fabriqué à partir de cellules desséchées et anuclées. La forte cohésion des cellules permet d'assurer un système très homogène. Les kératinocytes synthétisent des substances, les cytokératines, qu'ils conservent dans leur cytoplasme pour structurer cette barrière. Les cytokératines constituent le squelette internes des kératinocytes. Ce

squelette interne donne à ces cellules leur volume et augmente leur capacité de communication intercellulaire et facilite la captation de la mélanine. Plus l'épiderme sera riche en cytokératines, plus il sera efficace et donnera à la peau son aspect jeune. En facilitant le contact entre les cellules, les cytokératines préviennent la perte des NMS  
 5 (Natural Moisturizing Factors : facteurs d'hydratation naturels, tels que les céramides, le cholestérol et les acides gras).

La protection active de la peau est liée au fait que les kératinocytes sont les premières cellules de notre corps à être en contact avec l'extérieur. Elles ont donc développé une panoplie de composants destinés à informer notre organisme aux  
 10 éventuels changements des conditions de notre environnement. Pour ce faire, ces cellules sont capables de synthétiser des facteurs de croissance destinés à stimuler les cellules sous jacentes du derme (fibroblastes), notamment le PTH related peptide (PTHrp), synthétisé majoritairement par les kératinocytes et connu pour être un facteur de différenciation cellulaire.

15 La méthode utilisée a été la suivante. Elle met en oeuvre une technique semi-quantitative rapide qui permet d'apprécier le taux de chacune des protéines sécrétées présentes dans le cytoplasme cellulaire.

4.10 <sup>4</sup> cellules sontensemencées par chambres de 0,9 cm <sup>2</sup> (lames de 8 chambres NUNC) et mises en culture pendant une nuit. Après rinçage avec du tampon  
 20 HBSS, le milieu à 1% de la composition A ou le milieu de contrôle (à 0% de composition A) est ajouté (450 µl par chambre).

Les cultures sont incubées 48 h. Après élimination des surnageants et rinçage des cultures, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde pendant 30 min à 4°C puis rincées avec du tampon PBS.

25 200 µl d'anticorps primaires anti-cytokératines sont ajoutés. L'incubation dure 30 min à température ambiante. Les surnageants sont alors éliminés et les cellules sont rincées avec le PBS.

200 µl d'anticorps secondaires reconnaissant l'anticorps primaire et couplés à un marqueur fluorescent, en l'occurrence la fluorescéine, sont ajoutés. Après 30 min  
 30 d'incubation à température ambiante, les surnageants sont éliminés et les cellules sont



rincées au PBS. Les lames sont alors montées puis examinées au microscope inversé à fluorescence (détection par immunofluorescence de cytokératines intracytoplasmiques).

La quantité de protéines synthétisées, en l'occurrence des cytokératines, par les cellules et ainsi marquées est proportionnelle à l'intensité de la fluorescence résultant du marquage immunologique.

### 1.1.2) Résultats

Comme le montre les Figures 4 et 5, l'addition de 0,5% de la composition A dans le milieu de culture des kératinocytes a pour effet d'augmenter la synthèse des cytokératines. La composition A restaure l'activité des kératinocytes provenant de peaux âgées ainsi que la sécrétion de cytokératines par ces kératinocytes (action sur des kératinocytes sevrés en oestradiol; voir Figures 6, 7 et 8, 9).

En outre, la synthèse par les kératinocytes de PTHrp calcium dépendant est stimulée en présence de la composition A. Le PTHrp, synthétisé majoritairement par les kératinocytes, est particulièrement actif en présence de l'ion calcium fourni par la composition A et agit en synergie avec les cytokines de la matrice organique totale de la nacre présente dans la composition A.

La décorine, protéine d'adhésion majeure de la régénération cutanée est également stimulée en présence de la composition A.

Les cadhérines, protéines d'adhésion calcium dépendantes, sont aussi grandement responsables de la cohésion. Elles sont stimulées en présence de la composition A.

## 1.2) Activité de la composition A sur les fibroblastes, synthèse d'élastine

### 1.2.1) Synthèse d'élastine par des fibroblastes humains cultivés en présence de la composition A

La méthode utilisée est la même que celle décrite au paragraphe 1.1.1) ci-dessus pour l'étude sur les kératinocytes.

Comme cela ressort des Figures 10 et 11, la composition A à 1% de concentration stimule fortement la synthèse d'élastine par les fibroblastes humains.

1.2.2) Comparaison de l'effet des oestrogènes et du Biocrystal maxima m. sur des fibroblastes humains en culture (Figures 12, 13, 14 et 15).

Les fibroblastes matures peu actifs sont de forme très allongée, aplatie et présentent des noyaux denses. Les fibroblastes actifs ont des noyaux de grande taille, arrondis, avec de volumineux nucléoles, témoignant du processus actif de synthèse. Le type "fibroblaste actif" est observé dans les cultures d'explants de peau prélevés sur une femme de 50 ans sous traitement hormonal de substitution.

La privation d'oestrogènes dans le milieu de culture provoque une inactivation drastique des cellules. Elles ne sont plus adhérentes ni confluentes, certaines présentent un début de pycnose.

Les Figures 12 et 14 illustrent l'effet de la composition A sur des fibroblastes humains provenant d'explants de femme de 50 ans ménopausée (donc en baisse de sécrétion d'oestrogènes), sous traitement de substitution.

Les Figures 13 et 15 illustrent l'effet de la composition A sur des fibroblastes humains sevrés en oestradiol, provenant d'explants de femme de 50 ans ménopausée, sous traitement de substitution.

Comme cela ressort de ces Figures 12 à 15, la composition A, ajoutée à 1% au milieu de culture restaure complètement l'activité des fibroblastes sevrés. L'action de la composition A est remarquable : les fibroblastes ont un noyau bien développé, très clair, avec un nucléole proéminent. Leurs corps cellulaires fusiformes s'orientent et sont confluentes, permettant les échanges cellulaires. Des résultats similaires ont été obtenus en travaillant sur des cellules provenant d'explants de peaux jeunes.

**1.3) Activité de la composition A sur les mélanocytes : modification de la quantité de mélanine captée par des kératinocytes mis en culture en présence de la composition A.**

#### **1.3.1) Méthode**

Les mélanocytes sont les cellules pigmentaires responsables de la synthèse de la mélanine, pigment qui est à l'origine de la couleur de notre peau. Les cellules mélanocytaires représentent environ 2 à 4 % de la population épidermique totale. La couleur homogène de la peau est due à une répartition du pigment sur toute la surface

cutanée grâce au transfert de la mélanine sous forme de mélanosomes depuis les cellules sécrétrices (mélanocytes) vers les kératinocytes voisins qui la captent.

La méthode consiste à réaliser une co-culture kératinocytes/mélanocytes avec dosage de la mélanine.

5 Les kératinocytes et les mélanocytes sont toutes deux des populations cellulaires situées au niveau de l'épiderme. Elles sont obtenues à partir d'un prélèvement de peau après élimination du derme et digestion enzymatique de l'épiderme. Les cellules épidermiques ainsi isolées sont comptées au Coulter Counter (Coultronics) puis elles sont mises en culture dans un milieu de culture classique type Dubelco modifié (eagle  
10 medium) supplémenté avec de la glutamine, strptomycine/péniciline et 10% de serum de veau foetal . Les pourcentages sont ajustés en fonction des résultats obtenus. Ce milieu permet la survie des mélanocytes et des kératinocytes.

Après 4 jours d'incubation en présence de la composition A, les cellules sont digérées par un mélange NaOH/DMSO puis le surnageant est récupéré après  
15 centrifugation. La lecture est effectuée à 470 nm.

### 1.3.2) Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau 1 suivant et représentés par l'histogramme à la Figure 16.

20

**Tableau 2 :  $\mu\text{g}$  de mélanine captée par les kératinocytes**

	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	moyenne	écart type
témoin	0,150	0,149	0,148	0,149	0,001
Composition A (0,5 %)	0,150	0,132	0,140	0,141	0,009
Composition A (1 %)	0,139	0,137	0,143	0,140	0,003

25

La présence de 1% de la composition A provoque un changement de répartition significatif de la mélanine captée par les kératinocytes en évitant les concentrations ponctuelles (voir les Figures 17 et 18).

#### **1.4) Mise en évidence par immunocytochimie de la stimulation des kératinocytes et des fibroblastes par la composition A**

##### **1.4.1) Méthode**

5 Il s'agit une technique semi-quantitative rapide qui permet d'apprécier le taux de chacune des protéines (cytokératine et élastine) présentes dans le cytoplasme cellulaire.  $4.10^4$  cellules sontensemencées par chambre de  $0.9 \text{ cm}^2$  (lame de 8 chambres, NUNC) et mises en culture pendant une nuit. Après rinçage avec du tampon HBSS, le milieu à 1% de la composition A ou le milieu de contrôle (à 0 % de composition A) est ajouté  
10 (450  $\mu\text{l}$ /chambre). Les cultures sont incubées 48 heures. Après élimination des surnageants et rinçage des cultures, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde pendant 30 minutes à  $4^\circ\text{C}$  puis rincées avec du tampon PBS. 200 $\mu\text{l}$  d'anticorps anti-cytokératine et/ou anti-élastine sont ajoutés. L'incubation dure 30 minutes à température ambiante. Les surnageants sont alors éliminés et les cellules sont rincées avec le PBS.  
15 200 $\mu\text{l}$  du deuxième anticorps conjugué à la fluorescéine sont additionnés. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées au PBS. Les lames sont alors montées puis examinées au microscope à fluorescence inversée. Les quantités d'élastine ou de cytokératine synthétisées par les cellules sont proportionnelles à l'intensité de la fluorescence.

20

##### **1.4.2) Résultats**

L'addition de 1% de la composition A dans le milieu de culture des kératinocytes a pour effet d'augmenter la synthèse des cytokératines par les cellules kératinocytaires de l'épiderme. Cette stimulation a été observée d'une manière importante à partir de  
25 0.5% de la composition A.

Lorsque les fibroblastes sont incubés in vitro en présence de la composition A (à 1%) on assiste au bout de 48 heures à une augmentation très sensible de l'intensité de la fluorescence traduisant ainsi une stimulation de la synthèse de l'élastine par les fibroblastes du derme.

30

### 1.5) Activité anti-inflammatoire de la composition A : dosage de l'interleukine 1 (IL-1) sécrétée par les cellules promyélocytiques HL 60 traitées par la composition A

Au cours d'un processus d'inflammation, on assiste d'abord à une migration d'un grand nombre de cellules inflammatoires du sang périphérique vers les sites d'inflammation, puis à une sécrétion importante au niveau de ces sites de certaines cytokines et notamment de l'IL-1. Cette dernière est considérée comme ayant un rôle majeur.

Dans cette étude, la sécrétion de l'IL-1 est mesurée en utilisant une lignée cellulaire HL-60 en présence de la composition A.

La production de l'IL-1 est amplifiée par addition dans le milieu de culture de phytohémagglutinine (PHA) qui est un puissant stimulant de la sécrétion d'IL-1. L'IL-1 est quantifiée par la technique classique du dosage immunologique par ELISA à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre l'IL-1 humain.

15

#### 1.5.2) Résultats

Les résultats sont regroupés dans le tableau 3 suivant et représentés par l'histogramme à la Figure 19.

20 **Tableau 3 : mise en évidence de l'effet de la composition A sur la production d'interleukine 1 (IL-1, en picogrammes) sécrétée par les cellules promyélocytiques**

	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3	moyenne	écart type
Témoin	0,703	0,685	0,654	0,681	0,025
Composition A (0.5 %)	0,689	0,664	0,570	0,641	0,063
Composition A (1 %)	0,494	0,615	0,527	0,545	0,063

En présence de 1% de la composition A, on observe donc une baisse significative de la synthèse de l'IL-1 traduisant ainsi un effet anti-inflammatoire très

25

sensible de la composition A. Cet effet in vitro a également été observé lors d'implantations pratiquées chez le rat in vivo.

5 **1.6) Test de toxicité. Mise en évidence de la non cytotoxicité de la composition A :  
test M.T.T. d'activité mitochondriale**

**1.6.1) Méthode**

10 Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la réduction d'un sel de tétrazolium (M.T.T.) par la NADPH réductase mitochondriale de cellules vivantes en un produit formazan bleu-violet.

2.10<sup>4</sup> cellules dans 200 µl de milieu de culture sontensemencées dans chaque puits (plaque 96, NUNC), puis incubées pendant une nuit pour leur permettre de bien adhérer au plastique. Après rinçage des cellules avec du milieu sans sérum, les différentes concentrations contenues dans le milieu de culture (1 %, 0.5 % et 0.1 % de composition A) ou le milieu témoin (0 % de composition A) sont ajoutées à valeur de 200 µl/puits.

20 Après 48 heures d'incubation, les surnageants sont éliminés et les cellules sont rincées avec du tampon HBSS. 100 µl de milieu de culture contenant 20 % d'une solution de M.T.T. (bromure de 3-4,5-diméthylthiazol-2-gamma,1-2,5-diphényltétrazolium; "Thiazolyl Blue") sont additionnés dans chaque puits. La réaction s'effectue pendant 2 heures à l'étuve à 37° C à 5 % de CO<sub>2</sub>.

25 Pour permettre une meilleure solubilisation des cristaux de formazan, 100 µl de HCl 0.04N dans de l'isopropanol sont ajoutés puis la réaction colorée est lue à une longueur d'ondes de 570 nm par un lecteur de microplaques. Les valeurs sont également exprimées en densité optique.

**1.6.2) Résultats**

Les résultats sont regroupés dans le tableau 4 suivant et représentés par l'histogramme à la Figure 20.

**Tableau 4 : densités optique mesurées**

	Ech. 1	Ech. 2	Ech. 3	Ech. 4	Ech. 5	Ech.6	moyenne	écart type
Témoin	0,455	0,466	0,449	0,449	0,47	0,472	0,460	0,01
Composition A (1 %)	0,732	0,796	0,771	0,785	0,808	0,768	0,777	0,027
Composition A (0.5 %)	0,669	0,675	0,709	0,7	0,698	0,694	0,691	0,016
Composition A (0,1%)	0,643	0,648	0,617	0,624	0,621	0,628	0,630	0,013

La présence de la composition A dans le milieu de culture entraîne donc une augmentation importante de l'activité mitochondriale cellulaire. Cette stimulation de l'activité enzymatique est dose dépendante : plus la concentration en composition A est forte, plus l'activité est élevée. Mais, quelle que soit la teneur du milieu en composition A, l'activité mitochondriale des cellules est largement supérieure à celle des cellules témoins non traitées par la composition A.

## 2.7) Conclusions sur l'activité de la composition A évaluée in vitro

La composition A agit directement sur les couches les plus superficielles de l'épiderme.

Les composantes organiques et minérales de cet extrait s'expriment à plusieurs niveaux dans le métabolisme des kératinocytes en agissant sur l'activité des cellules de la couche basale.

Tout d'abord, la croissance, la division et la différenciation cellulaires sont stimulées puis les synthèses spécifiques des kératinocytes sont amplifiées, notamment celles des cytokératines et les médiateurs destinés au bon fonctionnement du derme comme par exemple le PTHrp favorisant la cascade de communications intercellulaires.

La séquence de différenciation des kératinocytes basaux, étoilés puis granulaires, est stimulée et régulée sans augmentation du nombre des cellules.

L'augmentation régulée du nombre des kératinocytes améliore la structure de l'épiderme et les jonctions dermo-épidermiques. La restructuration de l'épiderme contribue à une meilleure protection des couches les plus profondes.

L'amélioration des synthèses spécifiques telles que celles des cytokératines, stabilise les synthèses pigmentaires et assure une réparation physiologique de la mélanine au sein des kératinocytes se traduisant par l'absence de concentrations ponctuelles. L'amélioration de la protection cutanée se fait sans induire d'épaississement anormal de la peau, tout en contribuant à approfondir les plans cellulaires couchés sur la jonction dermo-épidermique.

C'est parmi l'ensemble des médiateurs sécrétés par les kératinocytes que l'on trouve des substances contribuant à améliorer la réponse de cellules à l'agression et à l'inflammation ainsi que les facteurs de communication permettant les échanges physiologiques entre épiderme et derme. Le renouvellement cellulaire de l'épiderme qui est de 4 à 6 semaines est maintenu à son rythme physiologique.

L'amplification de la synthèse des médiateurs augmente le recrutement de tout un ensemble de cellules et c'est parmi ces médiateurs que l'on trouve la Décorine apportée par la composition A au niveau épidermique.

#### **2.7.1) Au niveau épidermique**

En activant la synthèse de PTHrp, la composition A agit sur la croissance et la différenciation des kératinocytes. Cet effet est calcium dépendant, d'où l'intérêt de la présence du calcium ionisé dans la composition A.

L'induction de la division cellulaire et de l'index mitotique au niveau de la couche germinale se traduit par une réelle restructuration de l'épiderme qui devient plus résistant, plus profond et en continuelle interaction avec le derme qu'il protège de la déshydratation.

#### **2.7.2) Au niveau dermique**

La cascade de stimulation entraînée par les médiateurs locaux libérés au niveau de l'épiderme provoque la synthèse d'une très abondante matrice extracellulaire par les fibroblastes. Celle-ci est très structurée. Elle est notamment composée de protéoglycannes, de collagène et de protéines d'adhésion notamment de la Décorine, protéine d'adhésion jouant un rôle majeur dans les phénomènes de restructuration



cutanée (ou régénération tissulaire cutanée). Elle piège les cytokines et autres facteurs de croissance. Ces observations ont également été constatées in vivo chez le rat.

Par ailleurs, l'enrichissement en élastine sous l'effet de la composition A dont les fibres sont mieux orientées dans la couche conjonctive, permet aux tissus cutanés de  
5 garder leur souplesse et leur forme au cours des dégradations physiologiques entraînées soit par les carences et l'âge, soit par les agressions notamment les étirements.

Les fibroblastes turgescents sont recrutés au niveau des cellules souches précurseurs en nombre suffisant pour que l'effet dû à leur action et leur présence soient durables. Cet effet est entretenu par une microvascularisation accrue.

10 La peau est plus élastique et plus ferme. Elle est résistante. Ses composantes se renouvellent à un rythme soutenu.

Au niveau des différents types cellulaires de la peau, la composition A présente une action réparatrice et régulatrice de l'équilibre physiologique entre ses différents constituants. De plus, il présente l'avantage de l'innocuité totale et celui d'avoir un effet  
15 anti-inflammatoire, donc apaisant.

20

25

30

**Exemple 3 : crème hydratante****Crème Hydratante**

<b>Dénomination INCI</b>	<b>100 KG</b>
PEG-100 STEARATE GLYCERYL STEARATE	1.000
PARAFFINUM LIQUIDUM	3.500
LANOLINE	1.700
MYRISTYL ETOXY MYRISTATE	4.000
HUILES VEGETALES	4.000
CETYL ALCOHOL	2.500
TRIETHANOLAMINE	0.200
ANTIOXYDANT	0.030
PROPYL PARABEN	0.300
CARBOMER	0.250
DISODIUM EDTA	0.400
PROPYLENE GLYCOL	2.000
CONSERVATEUR	0.600
POLYACRYLAMIDE/C13-14	1.000
ISOPARAFFIN/LAURETH-7	
Composition A	2.500
PARFUM	TRACE
AQUA	QSP 100

5

10

15

### Revendications

1. Procédé de préparation d'une composition, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes consistant :

- 5       a) à réduire de la nacre en une poudre de granulométrie comprise entre environ 1 et environ 300  $\mu\text{m}$ ;
- b) à mettre la poudre de nacre ainsi obtenue en contact intime avec un agent d'extraction sous la forme d'une solution hydroglycolique d'au moins un collagène, d'au moins un protéoglycane ou d'un mélange de ces derniers; puis
- 10       c) à récupérer le mélange d'extraction, formé par la mise en contact intime, constituant la composition désirée.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la nacre est réduite en une poudre de granulométrie comprise entre environ 50 et environ 100  $\mu\text{m}$ .

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la nacre est réduite en  
15 une poudre de granulométrie comprise entre environ 15 et environ 50  $\mu\text{m}$ .

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant hydroglycolique de l'agent d'extraction présente un rapport pondéral eau:glycol compris entre environ 1 : 100 et environ 100 : 1.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en  
20 ce que l'agent d'extraction est une solution hydroglycolique d'au moins un collagène.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que le collagène est un collagène marin.

7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que le collagène est un collagène marin choisi dans le groupe constitué par le "PANCOGENE<sup>R</sup> MARIN", le  
25 "COLLAGENE NATIF MARIN - Code 690" et les mélanges de ces derniers.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que la concentration en collagène est comprise entre environ 0,0001 et environ 50 % en poids, par rapport au poids total de l'agent d'extraction.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en  
30 ce que l'agent d'extraction est une solution hydroglycolique d'au moins un protéoglycane.

10. Procédé selon la revendications 9, caractérisé en ce que le protéoglycane est choisi dans le groupe constitué par l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'éparane sulfate, le kératane sulfate et les mélanges de ces derniers.

11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce que l'agent  
5 d'extraction est une solution hydroglycolique d'acide hyaluronique.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que la concentration en protéoglycane est de préférence comprise entre environ 0,0001 et environ 40 % en poids, par rapport au poids total de l'agent d'extraction.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé  
10 en ce que l'on met la poudre de nacre en contact intime avec l'agent d'extraction selon l'étape b) en réalisant un mélange, constitué par la poudre de nacre et l'agent d'extraction, tel qu'il comprend, par rapport à son poids total, environ 20 à environ 60 % en poids de poudre de nacre obtenue à l'étape a) et le reste en agent d'extraction.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé  
15 en ce qu'on réalise la mise en contact intime à l'étape b), pour une température donnée, pendant un temps suffisant pour réaliser une extraction pratiquement complète.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que, à la fin de l'étape b) on récupère le mélange d'extraction, formé par la mise en contact intime, constituant la composition désirée, et l'on sépare la phase liquide de la  
20 phase solide de la composition.

16. Phase liquide telle qu'obtenue par le procédé selon la revendication 15.

17. Phase solide telle qu'obtenue par le procédé selon la revendication 15.

18. Composition susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes.

25 19. Composition selon la revendication 18, caractérisée par le fait qu'elle comprend au moins, sous forme d'une suspension hydroglycolique :

- de l'aragonite ( $\text{CaCO}_3$ ) ;
- des oligo-éléments choisis dans le groupe constitué par le sodium, le magnésium, le lanthane, le zinc, le brome, le césium, le fer, le manganèse, le chlore, le  
30 cuivre, le potassium, le calcium, le strontium, le soufre et les mélanges de ces derniers;
- des protéines fibreuses de la nacre;
- des protéines non fibreuses de la nacre, et

- au moins un collagène non issu de la nacre et /ou au moins un protéoglycane non issu de la nacre.

20. Composition selon la revendication 18 ou 19, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un collagène marin non issu de la nacre et au moins un  
5 protéoglycane non issu de la nacre choisi dans le groupe constitué par l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'éparane sulfate, le kératane sulfate et les mélanges de ces derniers.

21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, en tant que principe  
10 actif, et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

22. Composition pharmaceutique selon la revendication 21, caractérisée en ce l'excipient pharmaceutiquement acceptable est un excipient approprié pour une application dermatologique.

23. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à  
15 20, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des troubles de la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères.

24. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des troubles de la peau et/ou des phanères liés au vieillissement.

20 25. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement des manifestations cutanées inflammatoires.

26. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, en tant que principe cosmétiquement  
25 actif, et un excipient cosmétiquement acceptable.

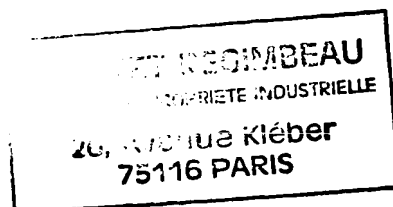
27. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée au traitement cosmétique pour la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères.

28. Utilisation de la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à  
30 20, pour la fabrication d'une composition cosmétique destinée au traitement cosmétique des modifications liées au vieillissement de la peau et/ou des phanères.

29. Méthode de traitement cosmétique pour la régénération tissulaire de la peau et/ou des phanères, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau et/ou les phanères la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

5 30. Méthode de traitement cosmétique des modifications liées au vieillissement de la peau et/ou des phanères, caractérisée en ce qu'on applique sur la peau et/ou les phanères la composition selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

10 ORIGINAL



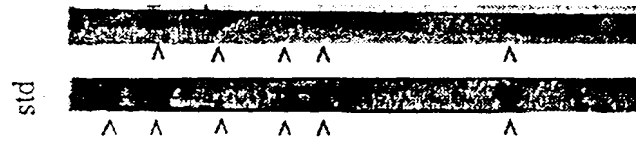
15

20

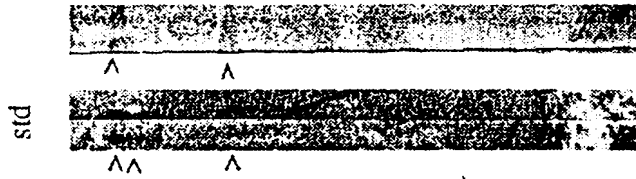
25

30

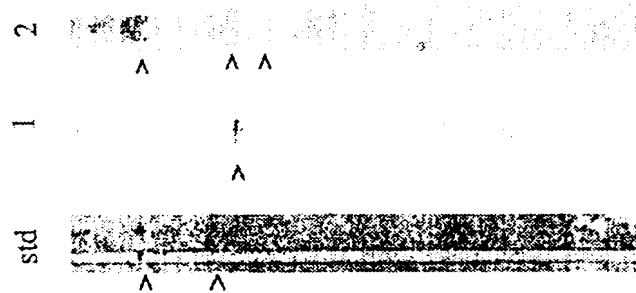
Collagène IX



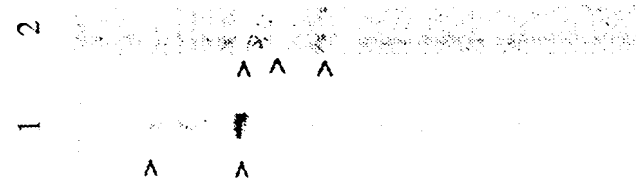
Collagène V



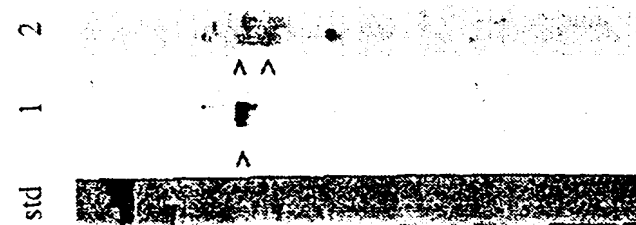
Collagène III



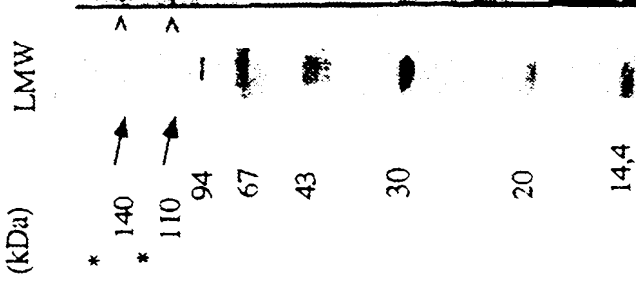
Collagène II



Collagène I



Marqueurs de poids  
moléculaires



\* Les marques 110 kDa et 140 kDa sont calculées à partir de l'équation  $rf = f(\log PM)$ .

Phosphatase  
alcaline

1 2

CGrp

std

PTHrp

Décorine

Ostéonectine

std

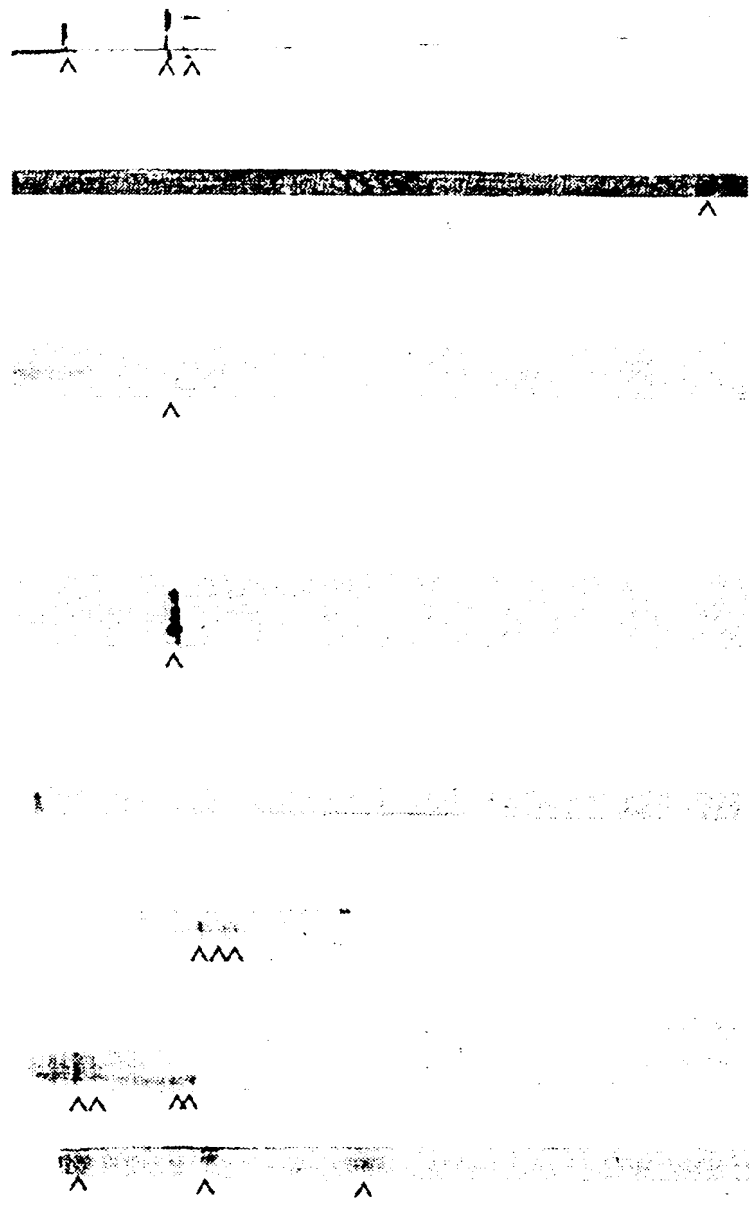
Ostéocalcine

std

Marqueurs de poids  
moléculaires  
(kDa)

LMW

\* 140  
\* 110  
94  
67  
43  
30  
20  
14,4



\* Les marques 110 kDa et 140 kDa sont calculées à partir de l'équation  $rf = f(\log PM)$ .

1: Détection biochimique de l'activité de la Phosphatase alcaline  
2: Détection immunochimique de la présence de la Phosphatase alcaline.



5

10

15

20

25

30

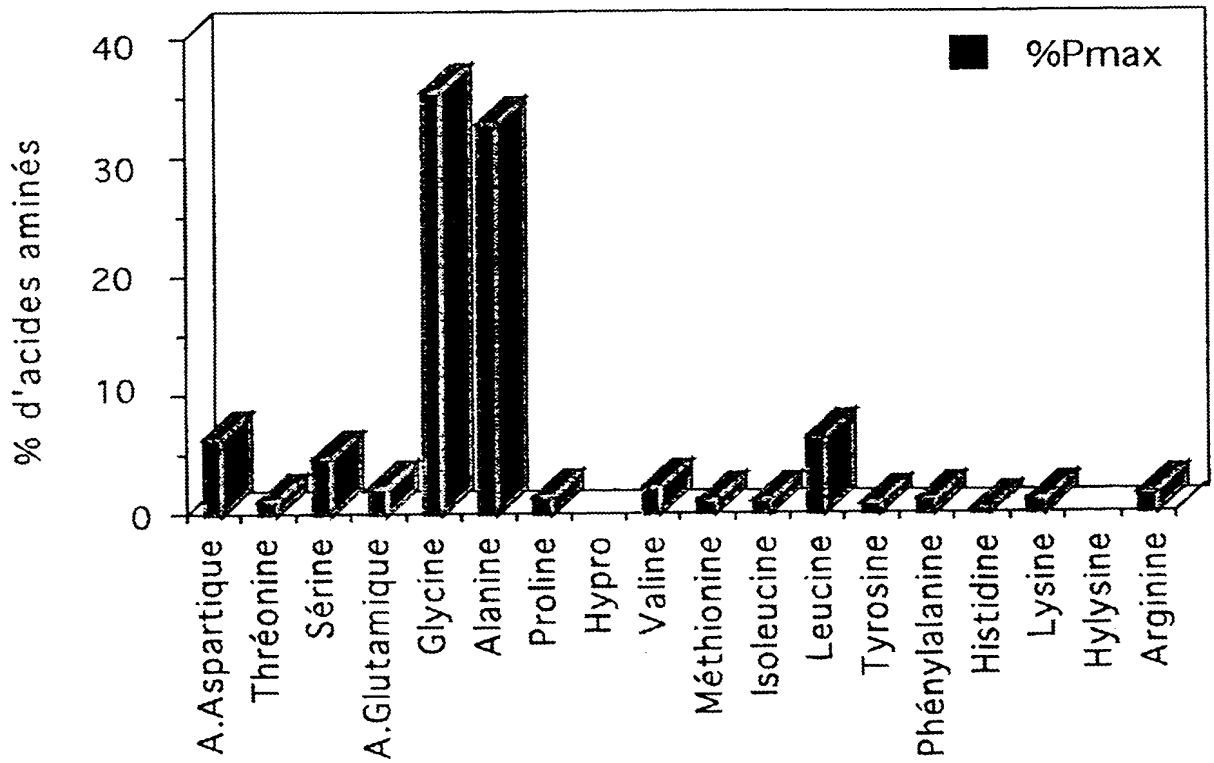


Figure 3 : composition globale en acides aminés de la phase protéique de la composition A

5

10

15

20

25

30

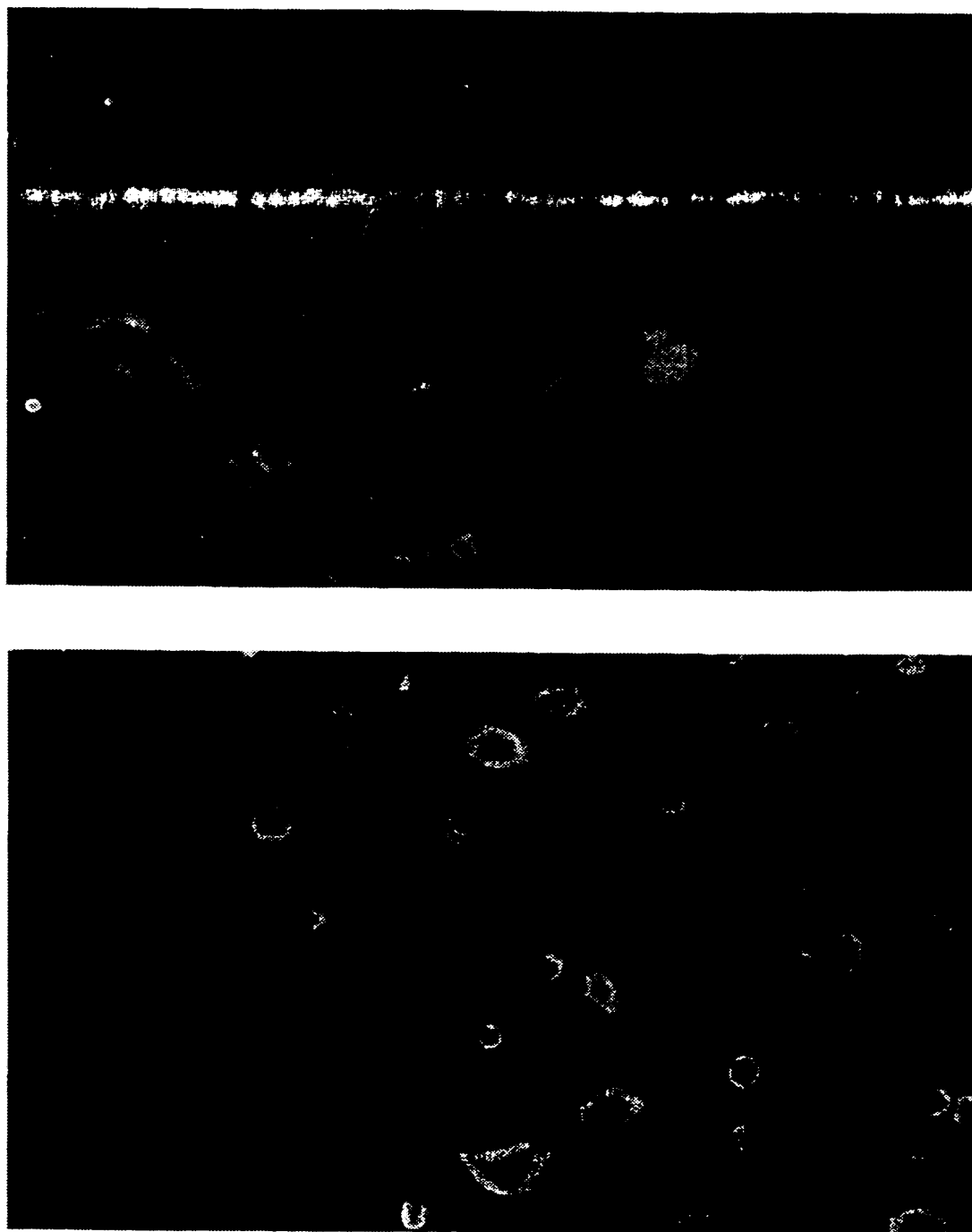
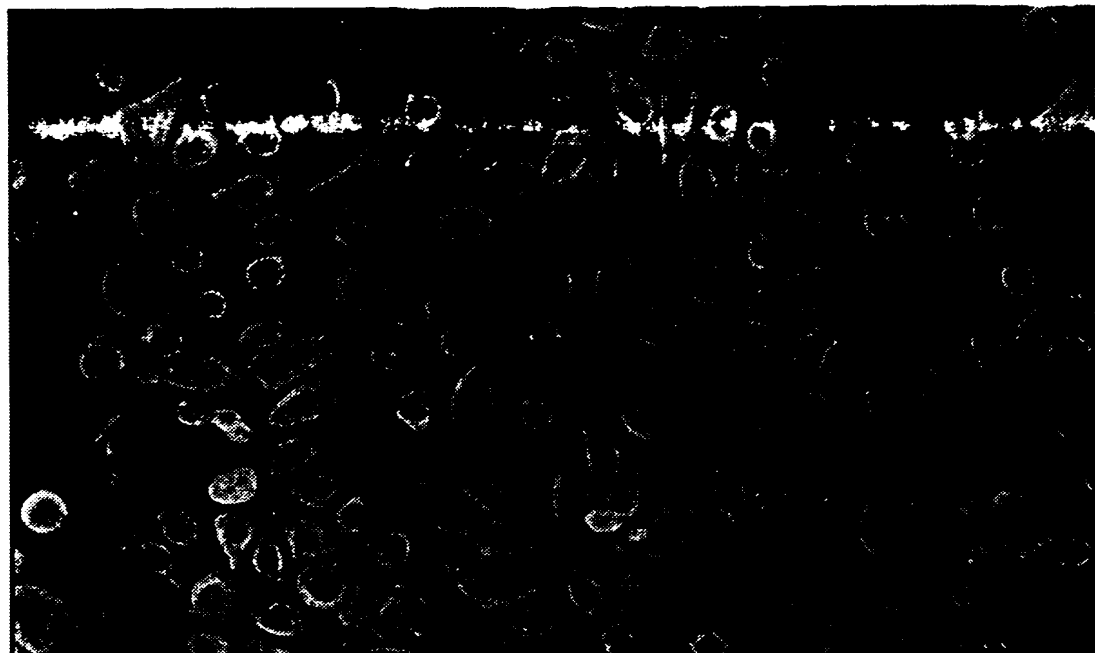


Figure 4 : synthèse de cytokératines par des kératinocytes humains (culture contrôle)

5

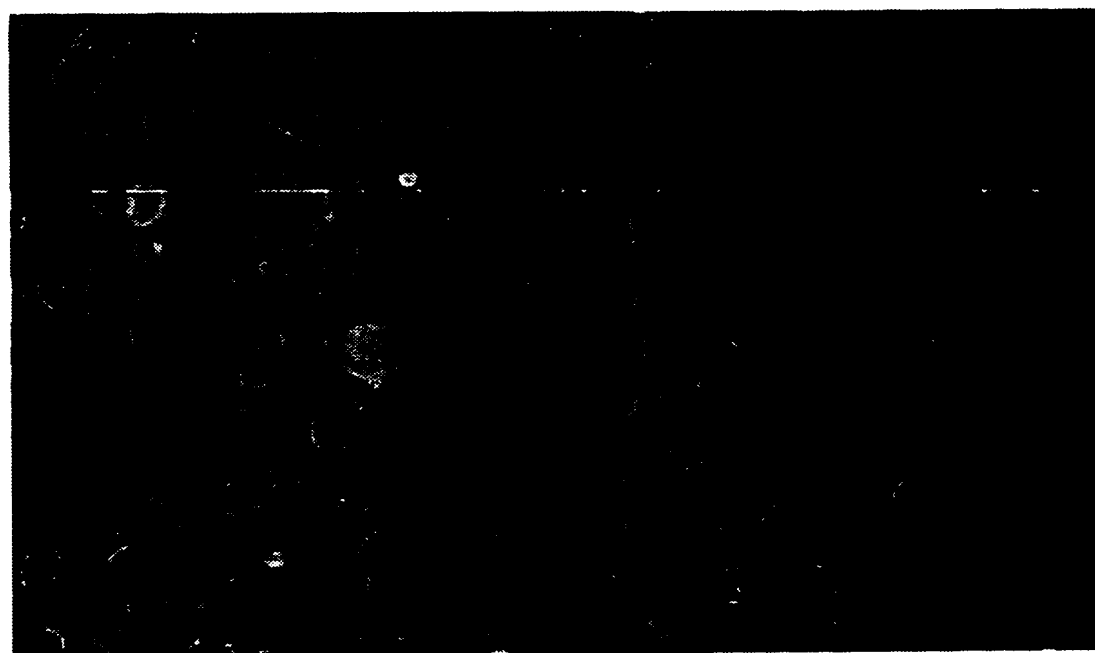
10

15



20

25

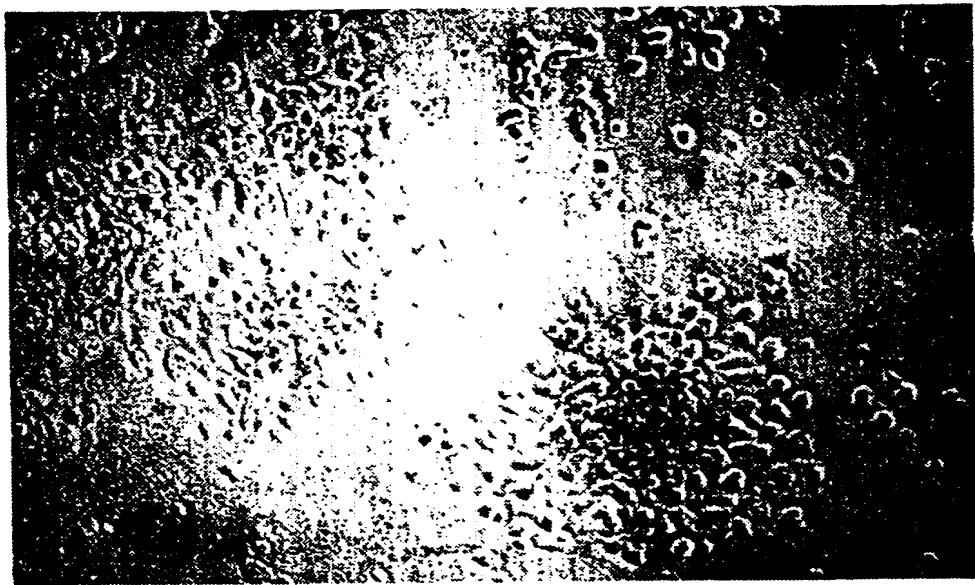


30

Figure 5 : effet de la composition A sur la synthèse de cytokératines par des kératinocytes humains

5

10

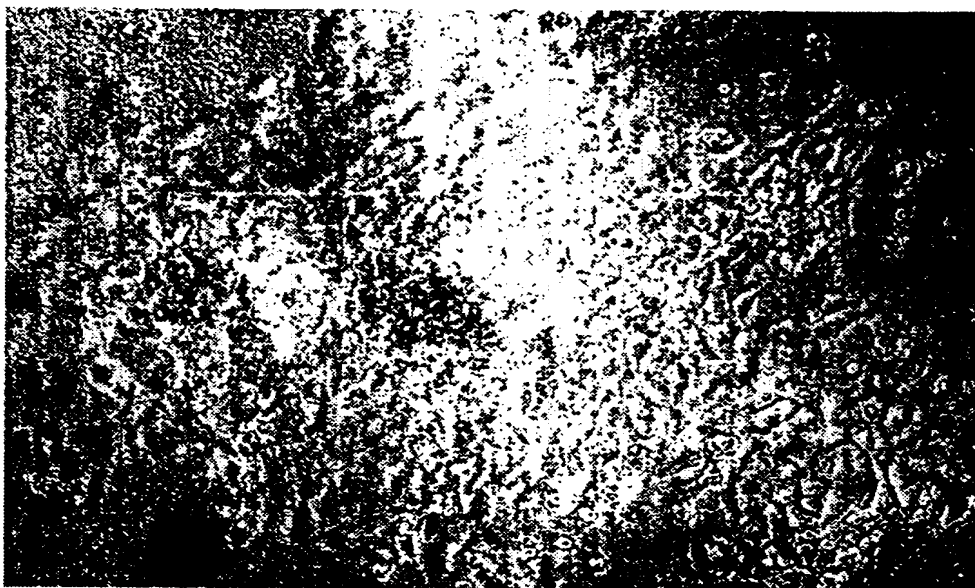


15

Figure 6 : kératinocytes humains en culture sevrés en oestradiol (culture contrôle)

20

25



30

Figure 7 : effet de la composition A sur des kératinocytes humains en culture sevrés en oestradiol

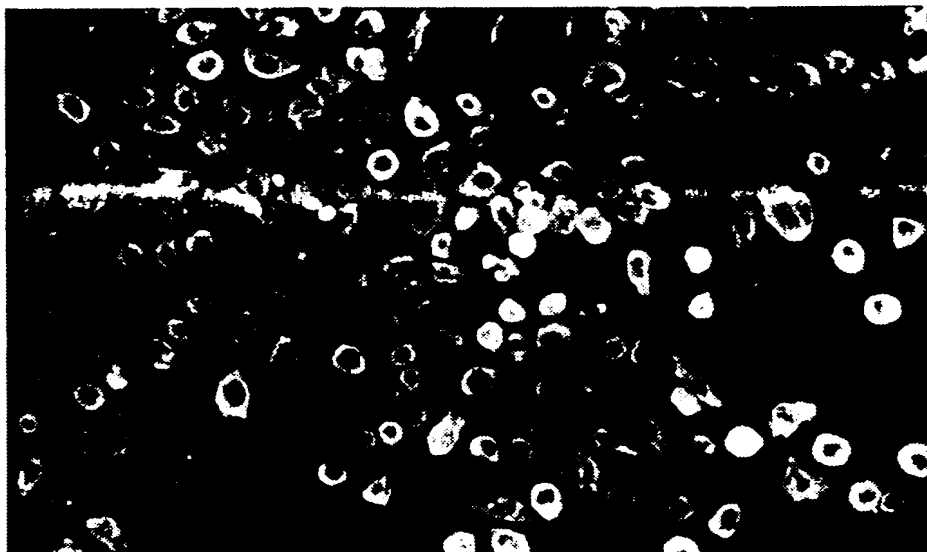
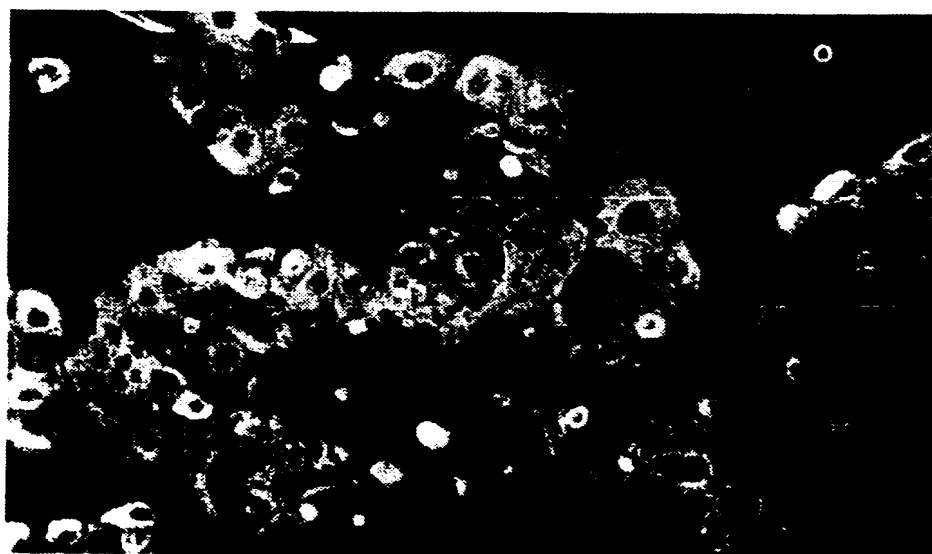


Figure 8 : synthèse de cytokeratines par des kératinocytes humains en culture sevrés en oestradiol (culture contrôle)

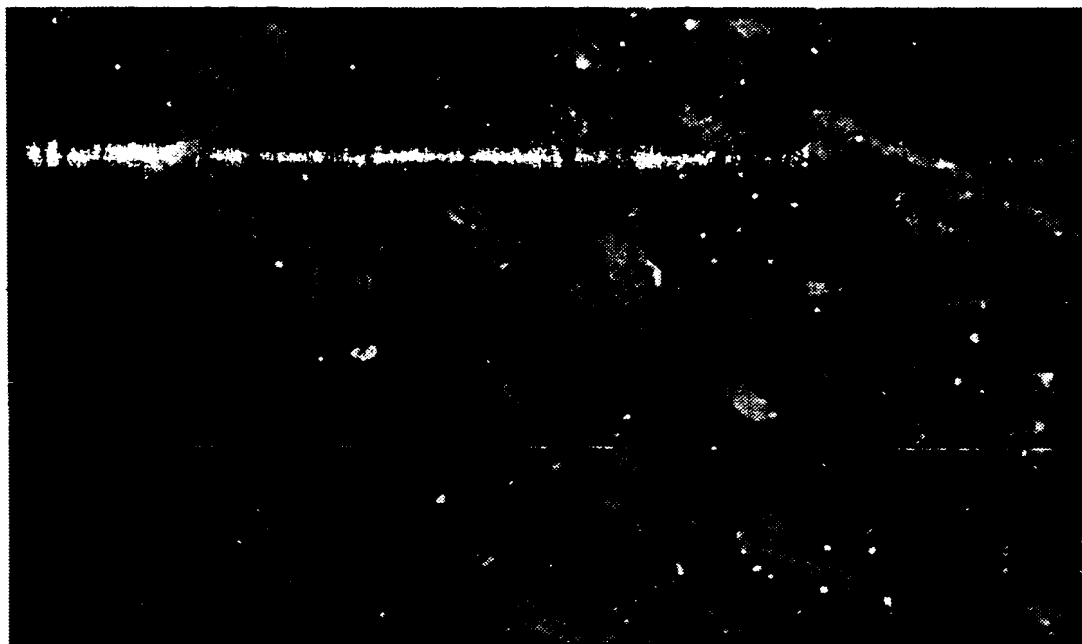


Figures 9 : effet de la composition A préparée selon l'invention sur la synthèse de cytokeratines par des kératinocytes humains en culture sevrés en oestradiol

5

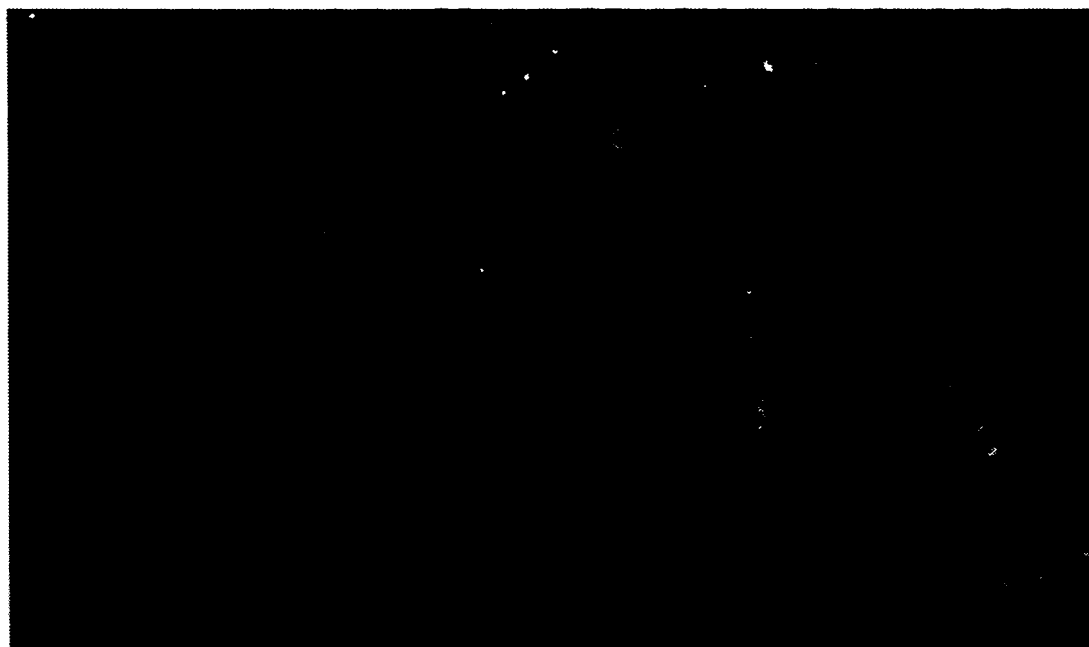
10

15



20

25



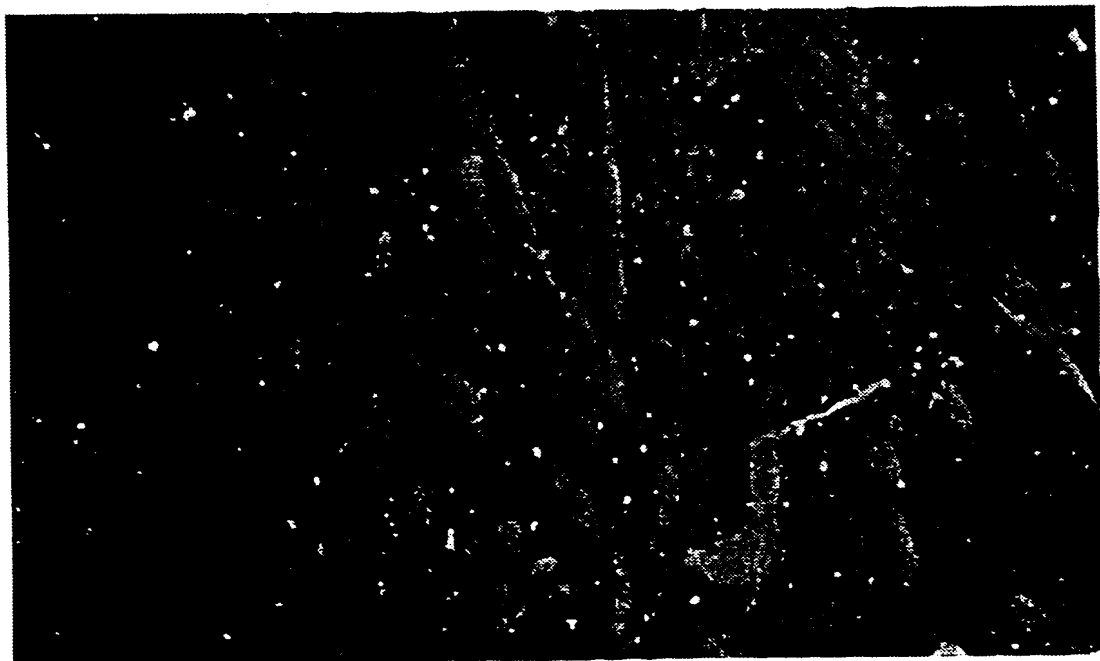
30

Figure 10 : synthèse d'élastine par les fibroblastes humains (culture contrôle)



10

15



20

25

30

Figure 11 : effet de la composition A sur la synthèse d'élastine par les fibroblastes humains



Figure 12 : effet des oestrogènes sur des fibroblastes d'explant de femme ménopausée sous traitement de substitution (culture contrôle de la Figure 14)



Figure 13 : effet des oestrogènes sur des fibroblastes d'explant de femme ménopausée sous traitement de substitution : culture en présence d'oestradiol puis sevrage et observation 1 heure après rinçage (culture contrôle de la Figure 15)

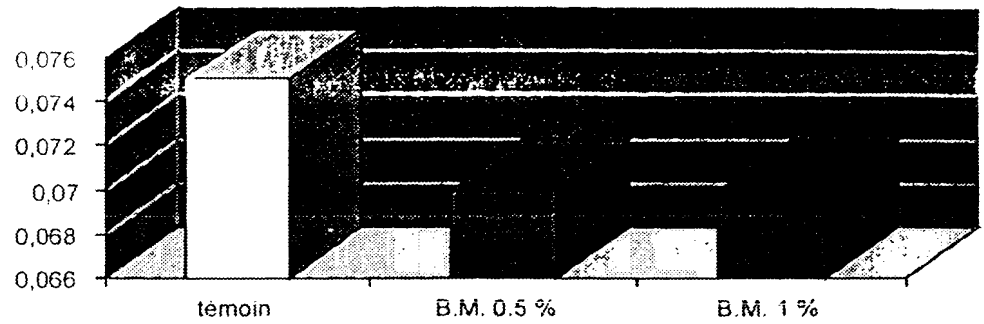




Figure 14 : effet de la composition A sur des fibroblastes sevrés en oestradiol d'explant de femme ménopausée sous traitement de substitution (voir culture contrôle à la Figure 12)



Figure 15 : effet de la composition A sur des fibroblastes sevrés en oestradiol d'explant de femme ménopausée sous traitement de substitution : culture en présence d'oestradiol puis sevrage d'oestradiol et ajout de la composition A. Observation 1 heure après rinçage (voir culture contrôle à la Figure 13)



5

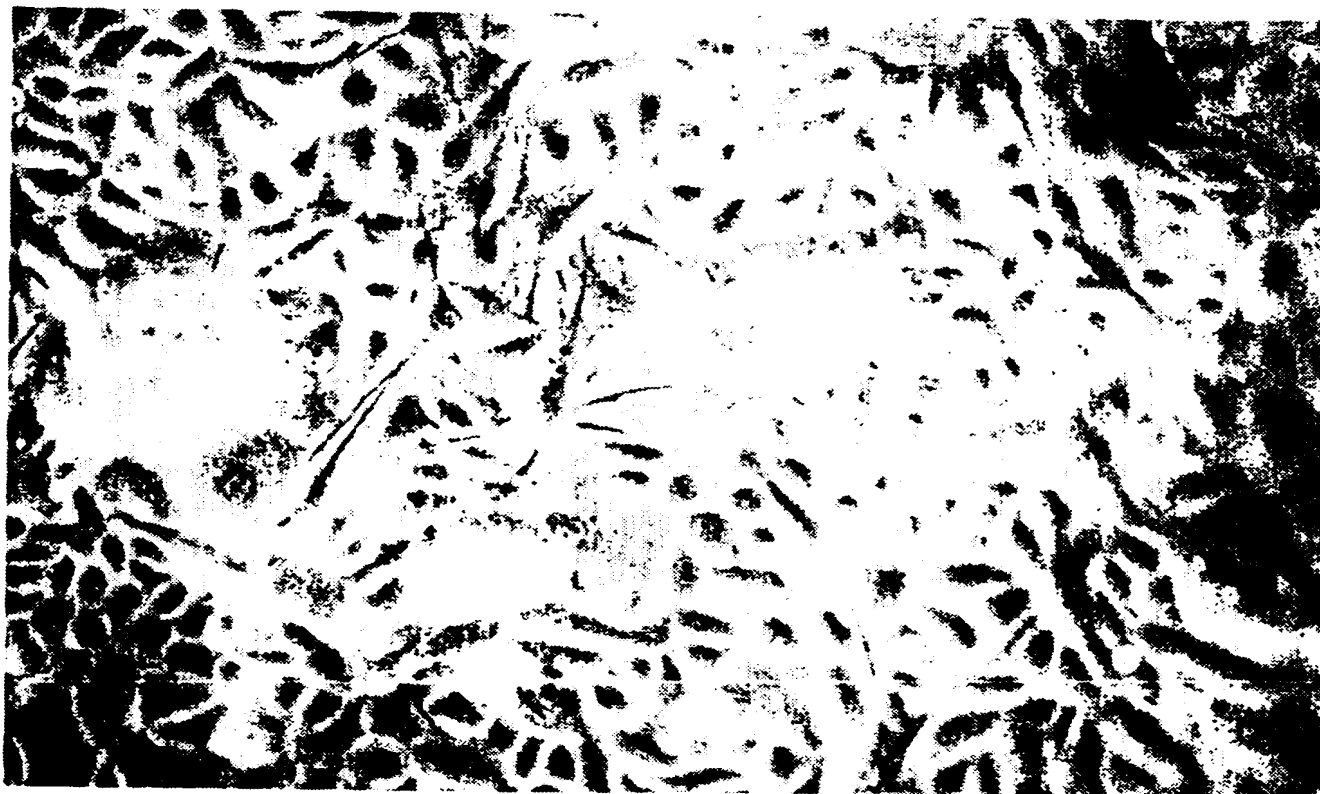
10

Figure 16 : effet de la composition A sur les mélanocytes : modification de la quantité de mélanine captée par des kératinocytes mis en culture en présence de la composition A

15

20

25

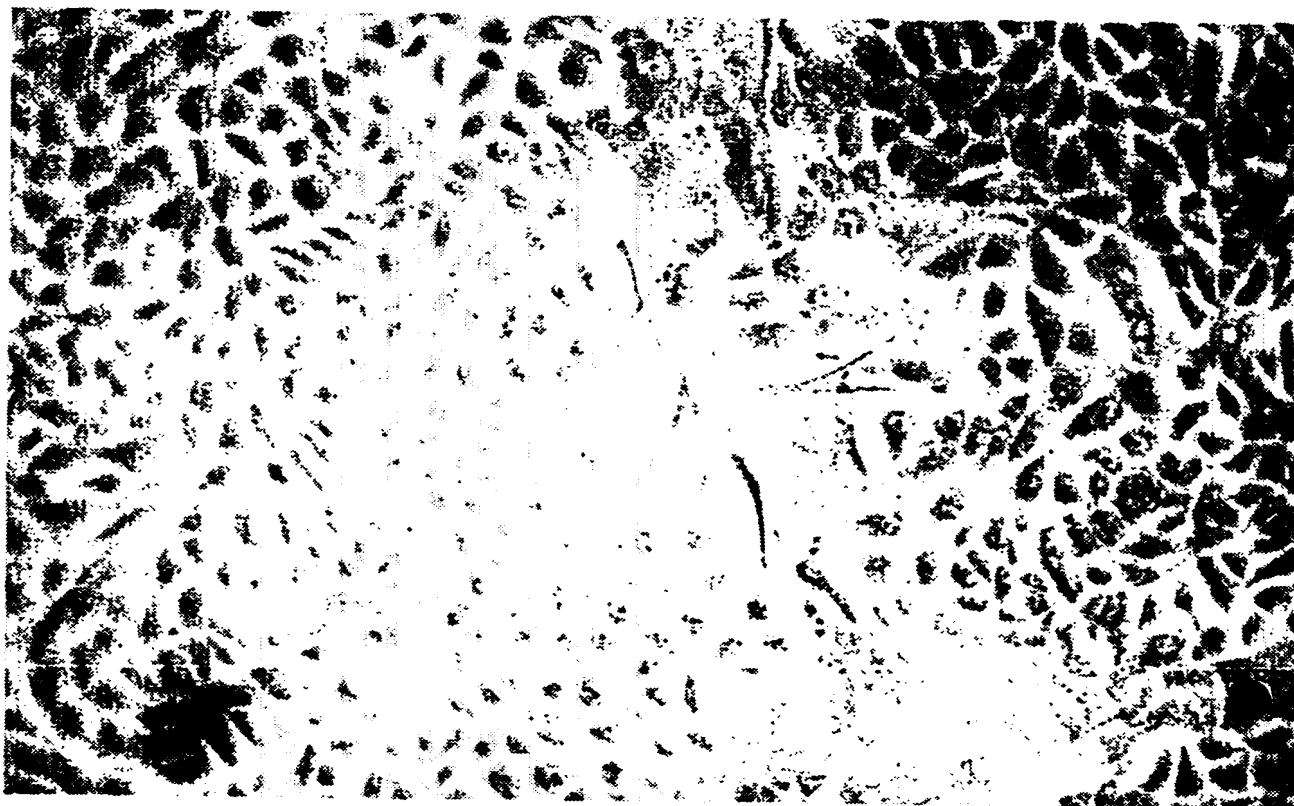


25

Figure 17 : coculture kératinocytes mélanocytes humains. Quantité de mélanine captée par les kératinocytes humains cultivés (contrôle)

30

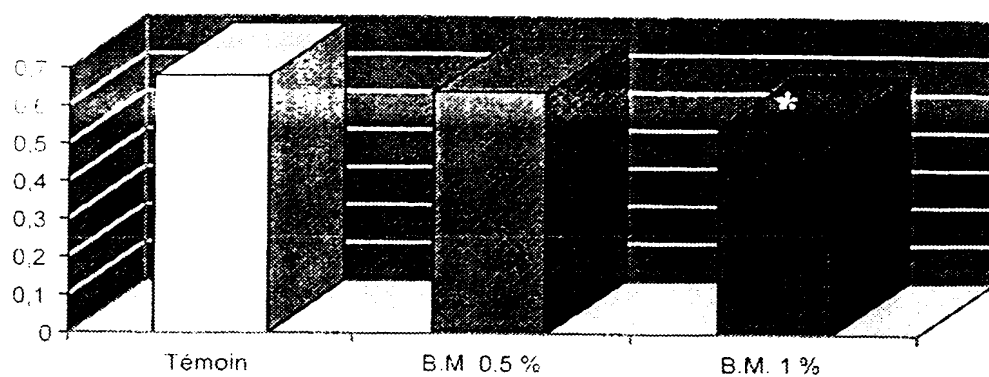
5



25

Figure 18 : effet de la composition A sur la quantité de mélanine captée par des kératinocytes humains cultivés

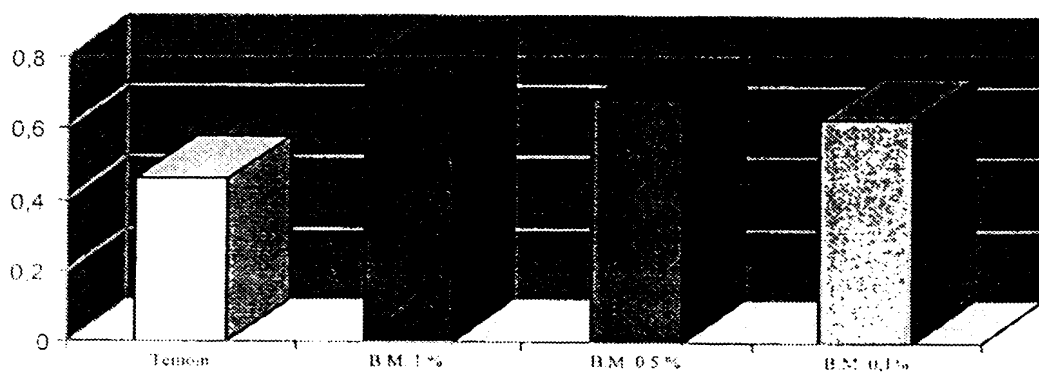
30



5

Figure 19 : effet de la composition A sur la sécrétion de l'interleukine 1 (IL-1) par les cellules promyélocytiques HL 60

10



15

Figure 20 : étude de la non cytotoxicité de la composition préparée selon l'invention : mesures des densités optiques

